



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología Molecular



**Dihidroxiacetona quinasa de *Citrobacter freundii* CECT 4626. Una aproximación integral a un nuevo biocatalizador para la formación de enlaces C-C.**

Memoria presentada por D. **Israel Sánchez Moreno** para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

**Director de Tesis: Dr. Eduardo García-Junceda Redondo.**  
**Instituto de Química Orgánica General. CSIC**

**Tutor: Dra. Elena Bogónez Peláez**

Madrid, 2009

TESIS DOCTORAL



# ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	7
Abstract.....	9
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>Aldolasas.....</b>	<b>13</b>
• <i>Aldolasas dependientes de DHAP.....</i>	<i>14</i>
• <i>El problema de la dependencia de DHAP.....</i>	<i>20</i>
- <i>Nuevos catalizadores biomiméticos.....</i>	<i>21</i>
- <i>Nuevas enzimas artificiales.....</i>	<i>22</i>
- <i>Nuevas enzimas naturales.....</i>	<i>25</i>
- <i>Miméticos de DHAP.....</i>	<i>27</i>
• <i>Estrategias para la síntesis eficaz de DHAP.....</i>	<i>28</i>
- <i>Síntesis química.....</i>	<i>28</i>
- <i>Síntesis enzimática.....</i>	<i>30</i>
<b>Dihidroxiacetona quinasas.....</b>	<b>33</b>
• <i>Filogenia y estructura de las DHAKs.....</i>	<i>35</i>
• <i>Función biológica de las DHAKs.....</i>	<i>39</i>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>Obtención de la DHAK de <i>C.freundii</i> CECT 4626.....</b>	<b>47</b>
• <i>Clonaje y análisis de la secuencia .....</i>	<i>47</i>
• <i>Sobre-expresión, purificación y análisis de la DHAK .....</i>	<i>50</i>
<b>Caracterización bioquímica de la DHAK de <i>C.freundii</i> CECT 4626.....</b>	<b>53</b>
• <i>Caracterización cinética.....</i>	<i>53</i>
- <i>Constantes cinéticas con respecto a la DHA.....</i>	<i>53</i>
- <i>Constantes cinéticas con respecto al Mg-ATP .....</i>	<i>54</i>
- <i>Inhibición por ADP y gliceraldehído .....</i>	<i>58</i>
- <i>Determinación del mecanismo de reacción.....</i>	<i>60</i>

- Estudios de actividad con distintos cationes divalentes.....	62
- Estudios de estabilidad y pH óptimo.....	64
- Estudios sobre la especificidad de sustrato.....	65
<b>Promiscuidad catalítica de la DHAK de <i>C.freundii</i> CECT 4626.....</b>	<b>69</b>
<b>Aplicabilidad sintética de la DHAK de <i>C.freundii</i> CECT 4626.....</b>	<b>84</b>
• <b>Producción enzimática de DHAP con regeneración de ATP.....</b>	<b>85</b>
• <b>Producción enzimática de GA con regeneración de ATP.....</b>	<b>89</b>
• <b>Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.....</b>	<b>91</b>
• <b>Estudio de aplicabilidad sintética del sistema multienzimático para la formación de enlaces C-C.....</b>	<b>100</b>
- Estrategia de reacciones en un único paso.....	100
- Estrategia de reacciones en dos pasos.....	103
• <b>Aldehídos <math>\alpha,\beta</math>-insaturados como sustratos de RAMA en el contexto del sistema multienzimático.....</b>	<b>106</b>
• <b>Síntesis de aldoles enantiocomplementarios a 13a empleando el sistema multienzimático .....</b>	<b>115</b>
<b>Modificación de la especificidad hacia el donador de fosfato mediante Evolución Dirigida de la DHAK.....</b>	<b>122</b>
• <b>Obtención de una genoteca de mutantes con variabilidad genética.....</b>	<b>127</b>
• <b>Screening mediante ensayo de actividad DHAK con poli-<math>P_i</math> .....</b>	<b>132</b>
• <b>Caracterización de los mutantes positivos de la primera generación .....</b>	<b>136</b>
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>143</b>
<b>La DHAK de <i>C. freundii</i> CECT 4626 es una nueva variante.....</b>	<b>143</b>
<b>La promiscuidad catalítica natural DHAK de <i>C. freundii</i> CECT 4626 y sus implicaciones evolutivas.....</b>	<b>149</b>
<b>Aplicabilidad sintética de la DHAK de <i>C. freundii</i> CECT 4626 en el contexto del sistema multienzimático.....</b>	<b>153</b>
<b>Evolución Dirigida de la DHAK de <i>C. freundii</i> CECT 4626 para modificar su especificidad de sustrato.....</b>	<b>158</b>

<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	165
<b>Materiales</b>	165
<b>Métodos</b>	167
• <b>Obtención de la DHAK de <i>C. freundii</i> CECT 4626</b>	167
- Amplificación del gen <i>dhak</i> de <i>C. freundii</i>	167
- Clonaje del gen <i>dhak</i> de <i>C. freundii</i>	168
- Sobre-expresión de la enzima DHAK de <i>C. freundii</i>	169
- Purificación de la enzima DHAK de <i>C. freundii</i>	170
• <b>Análisis de proteína</b>	176
- Estudio de aminoácidos	176
- Determinación de la concentración de proteína	177
- Determinación de la huella peptídica de la DHAK de <i>C. freundii</i>	177
• <b>Análisis de la actividad enzimática</b>	178
- Ensayos de actividad quinasa	178
<u>Ensayo enzimático <math>\alpha</math>-GDH/TIM</u>	178
<u>Ensayo enzimático como método de screening en ED</u>	179
<u>Ensayo enzimático PK/LDH</u>	180
<u>Ensayo de actividad para el cálculo del pH óptimo</u>	181
<u>Evaluación de la fosforilación mediante HPLC</u>	181
- Ensayos de actividad FMN-ciclasa	182
- Ensayos de actividad aldolasa	183
<u>Síntesis de sustratos no comerciales</u>	184
• <b>Determinación de los datos cinéticos y de inhibición</b>	186
- Estudios cinéticos sobre la DHAK de <i>C. freundii</i>	186
- Estudios de inhibición de la DHAK de <i>C. freundii</i>	187
- Análisis de los datos cinéticos	188
- Cálculo de la constante de estabilidad para el complejo [MgATP]	190
• <b>Estudios de docking molecular</b>	193
• <b>Similitud de secuencias y análisis filogenético</b>	194
• <b>Aplicabilidad sintética de la DHAK de <i>C. freundii</i></b>	194
- Reacciones para la producción enzimática de DHAP y GA3P	194
- Reacciones con el sistema multienzimático para la formación estereoselectiva de enlaces C-C	195
<u>Reacciones con la estrategia en un solo paso</u>	195

<u>Reacciones con la estrategia en dos pasos</u> .....	196
- <i>Métodos para el seguimiento de las reacciones enzimáticas</i> .....	197
<u>Ensayos de valoración enzimática de sustratos y productos</u> .....	197
<u>Ensayos de valoración por HPLC de sustratos y productos</u> .....	199
• <b>Purificación de productos fosforilados</b> .....	199
- <i>Cromatografía de intercambio aniónico</i> .....	199
- <i>Precipitación mediante sales de Ba<sup>2+</sup></i> .....	200
- <i>Purificación mediante HPLC</i> .....	200
• <b>Modificación de la especificidad hacia el sustrato donador de fosfato mediante Evolución Dirigida</b> .....	202
- <i>PCR propensa a error (EP-PCR)</i> .....	202
- <i>Recombinación in vitro mediante DNA shuffling</i> .....	203
- <i>Screening mediante ensayo de actividad en presencia de poli-P<sub>i</sub></i> .....	204
- <i>Análisis estadístico de los datos obtenidos en el screening</i> .....	205
• <b>Caracterización de los productos purificados</b> .....	208
- <i>Técnicas empleadas en la caracterización</i> .....	208
- <i>Lista de productos caracterizados</i> .....	210
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	219
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	223

## Abreviaturas.

$\alpha$ -GDH	$\alpha$ -glicerofosfato deshidrogenasa
AK	acetato quinasa
ATCC	American Type Cell Culture
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CFE	extracto crudo de proteína soluble
cFMN	riboflavina 4'-5'-fosfato cíclica
COSY	correlation spectroscopy
DHA	dihidroxiacetona
DHAK	dihidroxiacetona quinasa
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
Fuc-1P	L-fuculosa-1-fosfato
Fuc-1PA	L-fuculosa-1-fosfato aldolasa
FBP	fructosa-1,6-bifosfato
FBPA	fructosa-1,6-bifosfato aldolasa
GA	Gliceraldehído
HA	Hidroxiacetona
GA3P	gliceraldehído-3-fosfato
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation experiment
HMQC	heteronuclear multiple-quantum coherence experiment
IMAC	cromatografía de afinidad por iones metálicos
LB	Luria Bertani
NOESY	nuclear Overhauser effect
O/N	durante toda la noche
Poli-P <sub>i</sub>	polifosfato inorgánico
RAMA	fructosa-1,6-bifosfato aldolasa de músculo de conejo
Rha-1P	L-ramnulosa-1-fosfato
Rha-1PA	L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa
TIM	triosafosfato isomerasa





# ABSTRACT

Aldolases have been extensively used in chemoenzymatic syntheses because of their ability to catalyze the formation of C-C bonds with a high degree of stereochemical control. The main group of aldolases from the biocatalytic point of view is the one that uses dihydroxyacetone (DHA) phosphate as donor. Their main drawback is their strict specificity for the donor substrate. A straightforward strategy for DHAP preparation is the kinase-catalysed DHA phosphorylation, using ATP as phosphoryl donor. From this point of view, ATP-dependent DHA kinases have been given considerable attention because their feasibility for the simple and efficient obtaining of DHAP.

In this Thesis, an integral study of DHAK from *Citrobacter freundii* CECT 4626 as biocatalyst is described. This study includes:

- i) The cloning over-expression and a complete biochemical characterization of the enzyme. In the context of this study we also describe the promiscuous behaviour of this ATP-dependent DHAK. This enzyme, beside the transfer of the  $\gamma$ -phosphate of the ATP to DHA is able to catalyse the cyclization of the FAD to yield riboflavin 4',5'-cyclic phosphate (cFMN).
- ii) A multi-enzyme system for one-pot C-C bond formation, based on the use of this DHAK for *in situ* DHAP formation and DHAP-dependent aldolases for the catalysis of the aldol reaction, has been designed and developed. The multi-enzyme system was completed with the *in situ* regeneration of ATP catalysed by AK. In the context of this multi-enzyme system we have described for the first time that an  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde is efficiently accepted as substrate by RAMA.
- iii) Finally, we have initiated a Directed evolution Program to modified the specificity of DHAK for the phosphoryl donor. We have performed a first evolution generation consisting in a mutagenesis round followed by a round of artificial recombination. Surprisingly, when we screened this first generation for DHAK activity using poly-P as phosphoryl donor, we found sixteen positive mutants. After purification of these sixteen mutants, we could prove that three of them had activity in the order of 10 mU per mg of protein.



# **INTRODUCCIÓN**

De las tres grandes clases de macromoléculas biológicas —ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos—, son los carbohidratos, sin duda las menos conocidas. Tradicionalmente se ha reducido su papel biológico a funciones de reserva energética (como el almidón y el glucógeno) o estructurales (como la celulosa) pero el avance experimentado en los últimos años por la glicobiología ha desvelado la gran diversidad y complejidad de funciones que desempeñan (Dove, 2001; Finkelstein, 2007; van Aalten y Strynadka, 2008).

Los carbohidratos, formando parte fundamentalmente de glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares, desempeñan un papel clave en los procesos de comunicación de la célula con su entorno (Hakomori, 2004). La alteración de estos importantes procesos biológicos está en la base de muchas patologías como enfermedades inflamatorias crónicas (Dwek *et al.*, 2002), procesos tumorales y de metástasis cancerígena (Magnani, 2004), enfermedades congénitas como la distrofia muscular (Martin-Rendon y Blake, 2003) y muchas más (von Itzstein, 2008). Incluso existen evidencias sobre el papel crucial que juega una O-glicosilación en la serina 135 de la proteína PrPC en el cambio estructural de los priones hacia su forma patológica (PrPS) (Chen *et al.*, 2002). Su relación con estas y otras muchas causas de enfermedad ha despertado en los últimos años un renovado interés en los carbohidratos como punto de partida para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Koeller y Wong, 2000; Seeberger y Werz, 2007). En la actualidad se conocen múltiples derivados de carbohidratos con actividad terapéutica como antivirales y antimicrobianos (Ritter y Wong, 2001; Imberty *et al.*, 2008), anticancerígenos (Danishefsky y Allen, 2000; Sanchez *et al.*, 2005), antiinflamatorios (Boehncke y

Schon, 2003, Dube y Bertozzi, 2005), anticonceptivos (van der Spoel *et al.*, 2002) o para el tratamiento del rechazo en transplantes (Yarema y Bertozzi, 1998).

Uno de los retos a los que se enfrenta la síntesis de compuestos bioactivos es la necesidad de contar con estrategias altamente regio- y estereoselectivas para la obtención de fármacos enantioméricamente puros. La síntesis de carbohidratos y análogos no es una excepción, pues las propiedades farmacológicas de estos compuestos están directamente relacionadas con la disposición espacial de los sustituyentes en los monosacáridos u oligosacáridos.

La síntesis de carbohidratos presenta fundamentalmente dos problemas o dificultades sintéticas. En primer lugar, la necesidad de formar de manera estereocontrolada nuevos enlaces C-C para la obtención de monosacáridos, tanto naturales como derivados sintéticos de los mismos. La segunda dificultad reside en la formación regio- y estereoespecífica de los enlaces glicosídicos necesarios para construir oligosacáridos complejos mediante la unión de monosacáridos previamente formados. Los monosacáridos en general presentan múltiples grupos hidroxilo de parecida o igual reactividad, por lo que es necesario contar con reacciones altamente selectivas y estrategias eficaces para la protección de grupos funcionales. La presente Tesis Doctoral se centrará en el diseño y desarrollo de estrategias sintéticas capaces de solucionar el primero de los problemas: la formación de enlaces C-C.

## ALDOLASAS

Una buena alternativa a la síntesis orgánica clásica es la utilización de enzimas como catalizadores en síntesis asimétricas, dado su alto control de la estereoquímica (Faber y Kroutil, 2005, García-Junceda *et al.*, 2004). Por esta razón, en los últimos años se han desarrollado multitud de procedimientos enzimáticos y quimio-enzimáticos para la síntesis de derivados de carbohidratos con actividad farmacológica (Mike, 2007). En concreto, las aldolasas han despertado un gran interés por su capacidad para catalizar la formación

estereocontrolada de enlaces C-C, una de las reacciones básicas en síntesis orgánica, mediante adición aldólica reversible entre un aldehído aceptor y una cetona donadora (Breuer y Hauer, 2003; Iturrate y García-Junceda, 2008). Estas enzimas desarrollan su función *in vivo* principalmente en el metabolismo de carbohidratos, pero existen también aldolasas implicadas en rutas metabólicas de aminoácidos e hidroxiácidos. Las aldolasas están presentes en prácticamente cualquier organismo conocido –existen más de 30 identificadas hasta la fecha– y desde hace años se conocen y utilizan en síntesis quimioenzimática (Machajewski y Wong, 2000; Fessner y Helaine, 2001; Silvestri *et al.*, 2003; Hamilton, 2004; Samland y Sprenger, 2006). Podemos clasificar a las aldolasas en cuatro grupos en función del sustrato donador y del tipo de producto al que dan lugar (Samland y Sprenger, 2006):

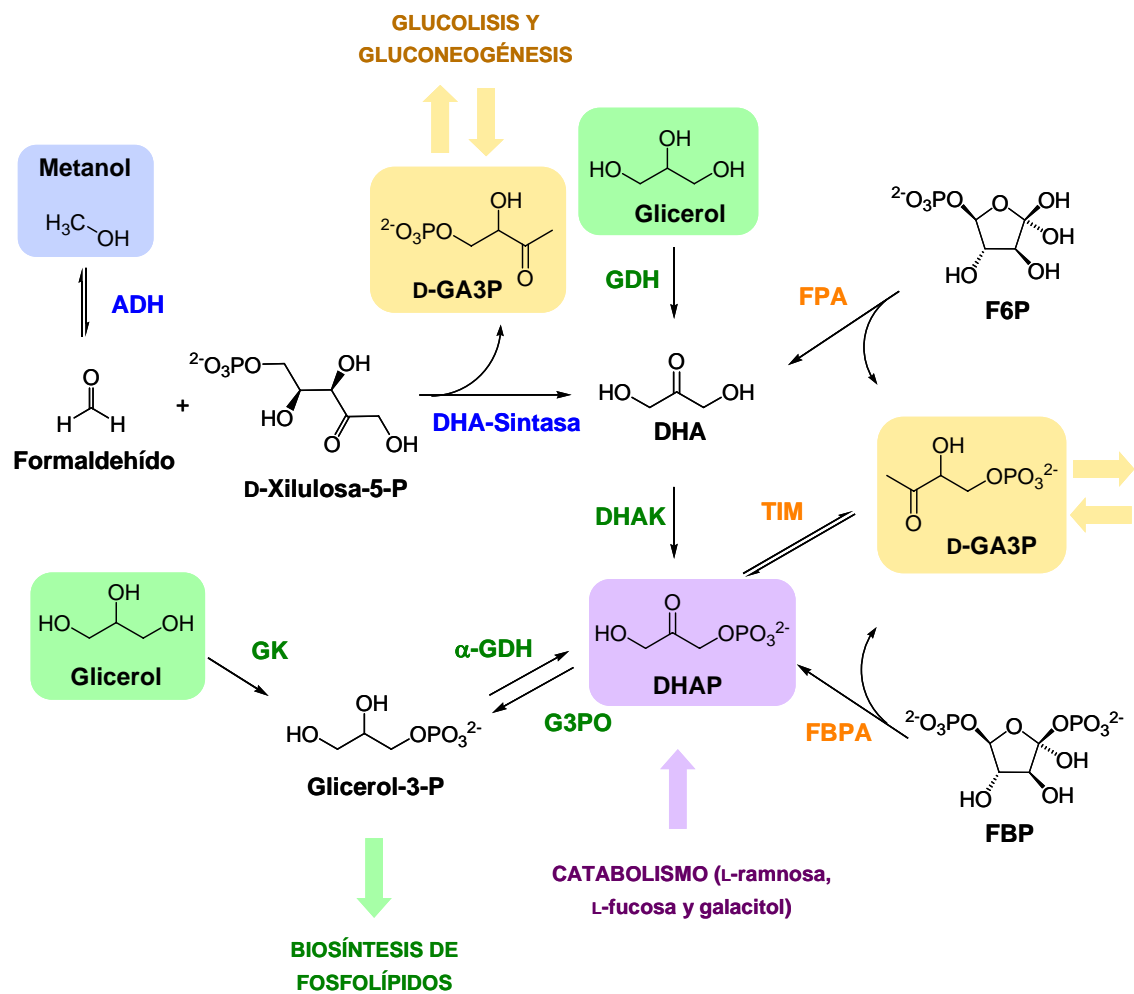
- Las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato, que dan lugar a la formación de cetosas-1-fosfato.
- Las aldolasas dependientes de piruvato o fosfoenol piruvato, que dan lugar a 3-deoxi-2-cetoácidos.
- Las aldolasas dependientes de acetaldehído, que dan lugar a 3-hidroxialdehídos.
- Las aldolasas dependientes de glicina, que dan lugar a la formación de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos.

De entre estos cuatro grupos, las aldolasas sin duda más utilizadas en síntesis orgánica son las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato.

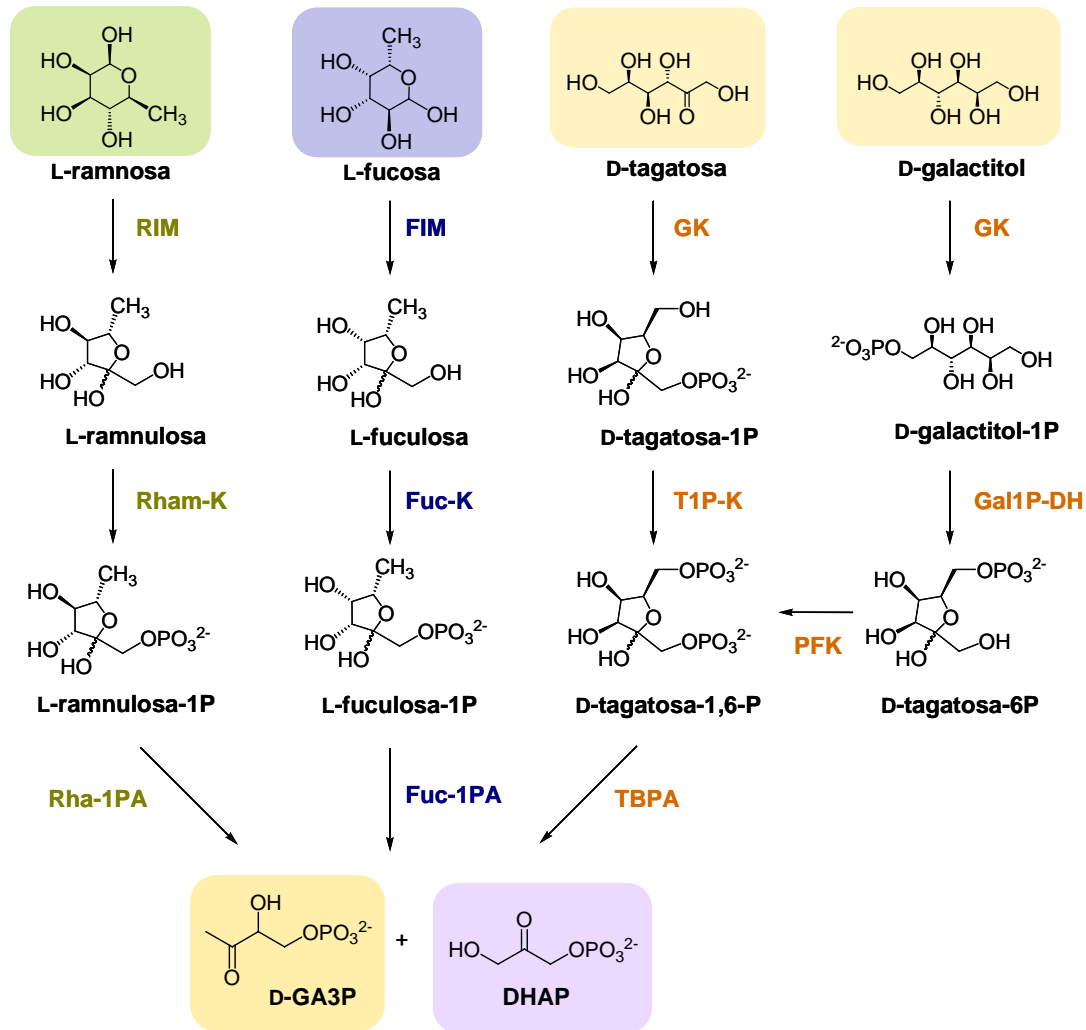
## **Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato**

Las aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato catalizan la adición aldólica entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y un aldehído aceptor. La DHAP es un compuesto que *in vivo*, está involucrado en diversas rutas metabólicas: es un intermedio de la glicolisis y la gluconeogénesis (Figura 1) forma parte del catabolismo de los carbohidratos L-fucosa, L-ramnosa y

galactitol (Figura 2), es un importante intermedio en el metabolismo del glicerol y en su disimilación anaeróbica por parte de algunos organismos (Figura 1), así como en la asimilación del metanol en levaduras metilotróficas y detoxificación del formaldehído en estos organismos (Figura 1) (Yurimoto *et al.*, 2005). Además es un intermedio en la regeneración de ribulosa-1,5-bifosfato en la fase oscura de la fotosíntesis.



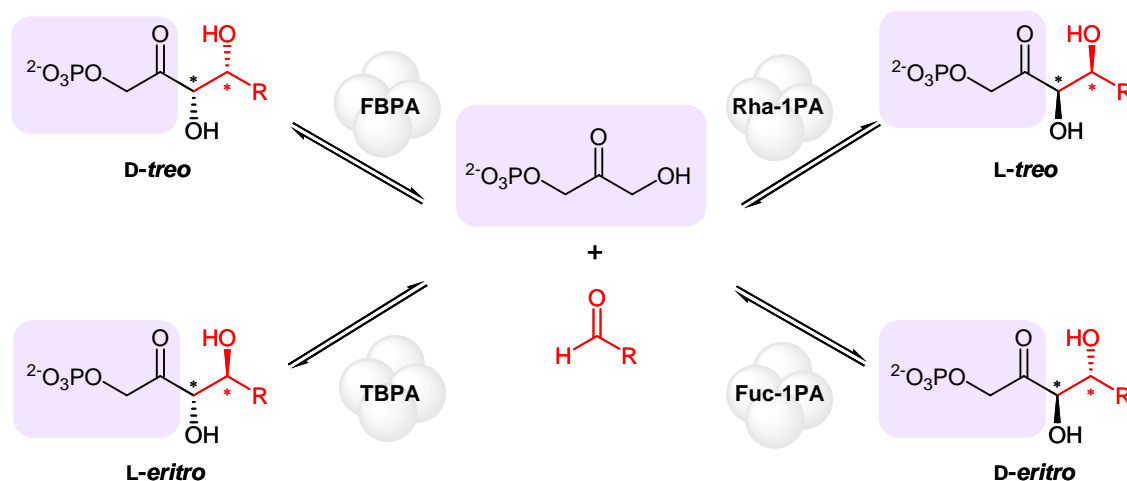
**Figura 1.** Origen metabólico de la DHAP. Alcohol deshidrogenasa (ADH) y la transketolasa DHA-sintasa son usadas por levaduras metilotróficas para la asimilación del metanol y detoxificación del formaldehído. Glicerol quinasa (GK) y  $\alpha$ -glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\alpha$ -GDH) intervienen en la disimilación de glicerol en presencia de oxígeno mientras que glicerol deshidrogenasa (GDH) y dihidroxiacetona quinasa (DHAK) permiten su disimilación en condiciones anaeróbicas. A partir de DHAP se puede formar glicerol-3-fosfato mediante la glicerol-3-fosfato oxidasa (G3PO). La triosafosfato isomerasa (TIM) convierte D-gliceraldehído-3-fosfato (D-GA3P) en DHAP, y participa en glicolisis y gluconeogénesis junto a la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA) o la fructosa-6-fosfato aldolasa (FPA).



**Figura 2.** Catabolismo de L-ramnosa, L-fucosa, L-tagatosa y galactitol. La L-ramnosa isomerasa (RIM) cataliza la isomerización de la L-ramnosa a L-ramnulosa, que posteriormente es fosforilada por la L-ramnulosa quinasa (Rham-K) para obtener L-ramnulosa-1-fosfato. La L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA) cataliza el paso final para obtener DHAP y D-GA3P. El catabolismo de L-fucosa es muy similar al de L-ramnosa: participan los enzimas L-fucosa isomerasa (FIM), L-fuculosa quinasa (Fuc-K) y finalmente la L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA). El catabolismo de la D-tagatosa comienza con una fosforilación catalizada por una glucoquinasa (GK) para obtener D-tagatosa-1-fosfato, que es nuevamente fosforilada por la D-tagatosa-1-fosfato quinasa (T1P-K), obteniéndose la D-tagatosa-1,6-bisfosfato. Finalmente se obtienen DHAP y D-GA3P por mediación de la D-tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA). El D-galactitol puede ser directamente fosforilado para obtener D-glicidol-1-fosfato, a partir de la cual se forma D-tagatosa-6-bisfosfato mediante el enzima D-glicidol-1-fosfato deshidrogenasa (Gal1P-DH). La D-tagatosa-6-bisfosfato es nuevamente fosforilada con mediación de una fosfofructoquinasa (PFK) para obtener D-tagatosa-1,6-bisfosfato. El catabolismo del D-galactitol y D-tagatosa convergen en su parte final catalizada por TBPA.



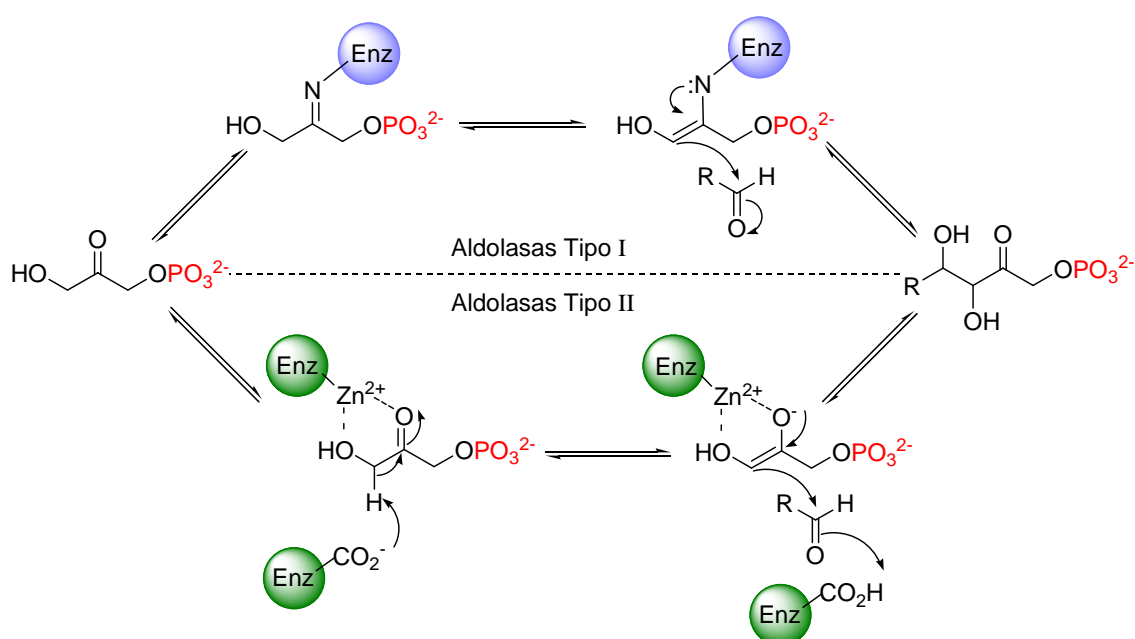
Son cuatro las aldolasas de esta familia las empleadas en el campo de la síntesis orgánica: la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA), tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA), L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA). El L-lactaldehído es el aceptor natural de Fuc-1PA y Rha-1PA, y el D-gliceraldehído-3-fosfato el de FDPA y TDPA (Figura 3). Su mayor interés sintético reside en que, en la cetosa-1-fosfato resultante se forman dos nuevos centros estereogénicos cuya estereoquímica está controlada, salvo excepciones (Fessner *et al.*, 1991; Espelt *et al.*, 2003), por la enzima y no por los sustratos. Además, las aldolasas de esta familia son enantiocomplementarias; es decir: su uso permite sintetizar los cuatro diastereoisómeros posibles a partir de un par de sustratos dado (García-Junceda *et al.*, 1995). Aunque esta afirmación es de uso generalizado, no es completamente cierta ya que la tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa no presenta control de la estereoquímica sobre la reacción de adición aldólica cuando se emplean aldehídos distintos al natural (Fessner *et al.*, 1992).



**Figura 3.** Aldolasas dependientes de dihidroxiacetona fosfato: fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (FBPA), tagatosa-1,6-bisfosfato aldolasa (TBPA), ramnulosa-1-fosfato aldolasa (Rha-1PA) y fuculosa-1-fosfato aldolasa (Fuc-1PA). Los nuevos centros estereogénicos formados en la reacción aldólica se señalan con asteriscos.

Mecánicamente, las aldolasas dependientes de DHAP pueden dividirse en dos grupos (Figura 4):

- Aldolasas de tipo I: están presentes en todos los organismos desde procariotas a eucariotas y se caracterizan por la formación de una base Schiff entre una lisina del centro activo y el carbono carbonílico de la cetona donadora.
- Aldolasas de tipo II: se encuentran solamente en procariotas y levaduras, algas y hongos. Estas enzimas requieren un metal divalente como cofactor, generalmente  $\text{Zn}^{2+}$ , que actúa como ácido de Lewis activando al nucleófilo.



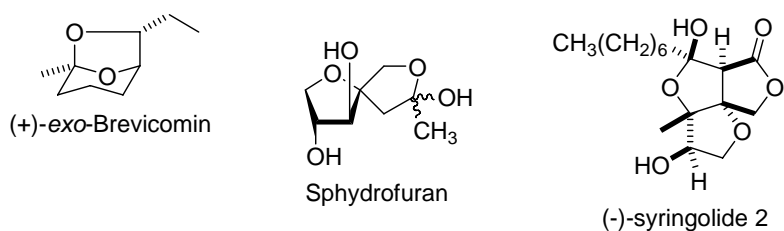
**Figura 4.** Mecanismo de reacción de las aldolasas dependientes de DHAP.

Las aldolasas dependientes de DHAP presentan una gran especificidad por la cetona donadora, aunque toleran un amplio rango de aceptores (Schoevaart *et al.*, 2000; Fessner y Helaine, 2001), incluyendo aldehídos alifáticos poco impedidos, aldehídos con heteroátomos  $\alpha$ -sustituídos (Bednarski *et al.*, 1989), monosacáridos y sus derivados (Bednarski *et al.*, 1986). En general, los aldehídos con impedimentos estéricos, los aromáticos y los  $\alpha,\beta$ -insaturados no se consideran sustratos, aunque existen ejemplos en bibliografía donde aldehídos  $\alpha$ -ramificados sí son sustratos de aldolasas cuando son sometidas a entrecruzamiento químico para su inmovilización (Sobolov *et al.*, 1994) y

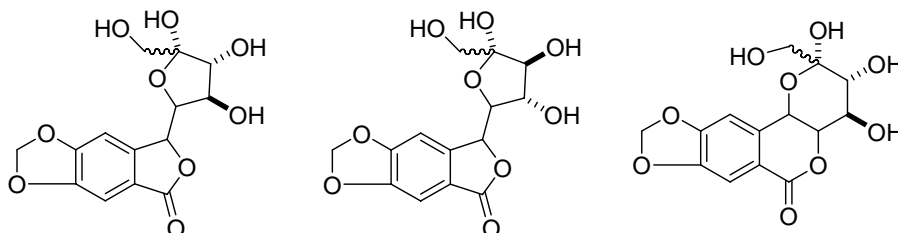
muchos aldehídos aromáticos con baja solubilidad en medio acuoso pueden actuar como aceptores moderados de estas aldolasas empleando co-disolventes en el medio de reacción (Espelt *et al.*, 2003; Espelt *et al.*, 2005).

Una de las principales aplicaciones de las aldolasas dependientes de DHAP es la síntesis de iminociclitolos. El interés de estos compuestos radica en que pueden actuar como inhibidores de glicosidasas y glicosiltransferasas, con lo que presentan potencial aplicación como antibióticos, fármacos anti-metastásicos, antihiper glucemia o inmunoestimuladores. Además, también pueden actuar como chaperonas químicas, asistiendo al plegamiento y estabilización de proteínas cuya inactivación es la causa de diversos desórdenes metabólicos (Okumiya *et al.*, 2007; Suzuki, 2008).

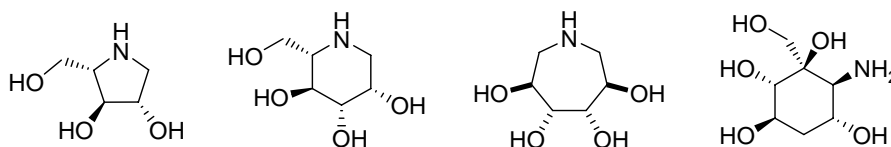
#### Productos naturales



#### Análogos de Pancratistatina



#### Imino- y aminociclitolos



**Figura 5.** Productos cuya ruta de síntesis requiere la participación de alguna de las aldolasas dependientes de DHAP.

La aplicación de aldolasas dependientes de DHAP a la síntesis de productos naturales distintos de carbohidratos es menos habitual. Moléculas complejas como el elicitor microbiano siringólido 2 (Chênevert y Dasser, 2000) o diversos análogos de la pancratistatina (Phung *et al.*, 2003) son ejemplos de esta aplicación. Otros productos naturales que se obtienen incluyendo el uso de una aldolasa dependiente de DHAP en su ruta sintética son la brevicomina (Schultz *et al.*, 1990), el fragmento C3-C9 de la aspíclina (Chênevert *et al.*, 1997), el fragmento C11-C16 de la pentamicina (Shimagaki *et al.*, 1993) o el fragmento C12-C20 de la anfotericina (Malleron y David, 1996).

### **El problema de la dependencia de DHAP**

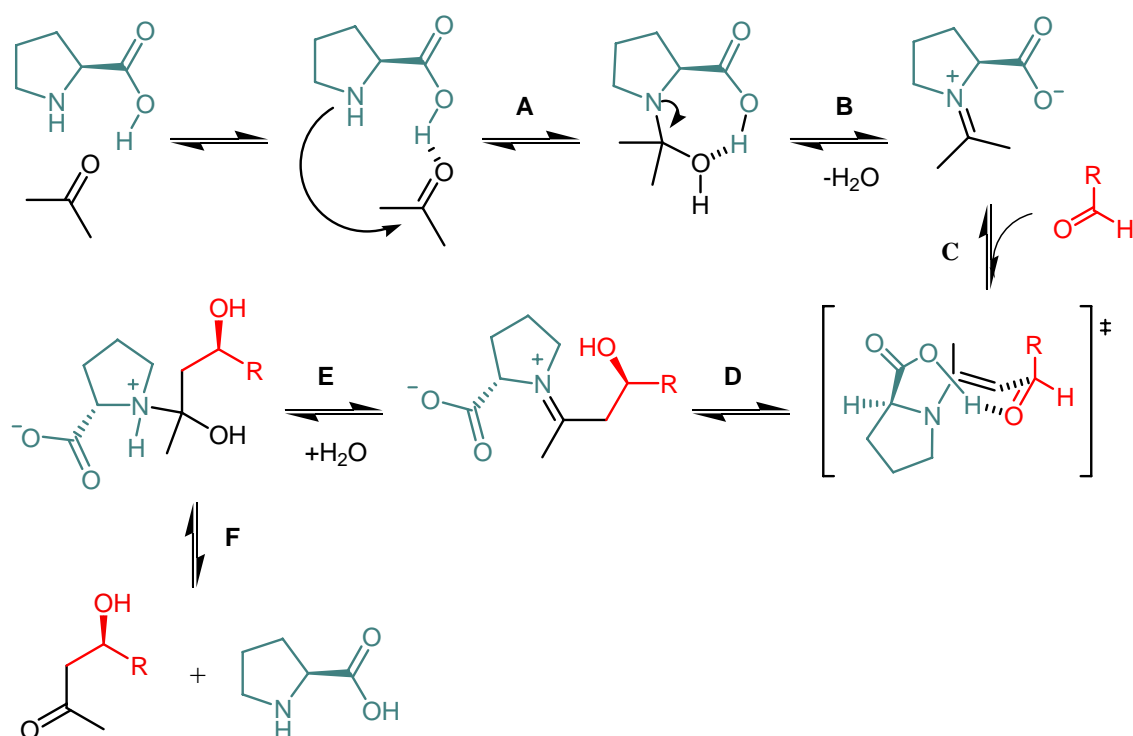
Sin embargo, la aplicación de esta familia de aldolasas en síntesis tiene una limitación importante: su dependencia de DHAP. Los problemas que plantea la dependencia de la DHAP se pueden resumir en los siguientes: i) restringe su campo de aplicación; ii) su síntesis química es compleja y con rendimientos moderados, lo que hace que su coste sea muy elevado e imposibilita su uso a gran escala y iii) es lábil a pH neutros y básicos por lo que tiende a degradarse durante la reacción catalizada por las aldolasas, lo que implica menores rendimientos en la obtención del aldol.

¿Es posible evitar el uso de la DHAP?

Como hemos comentado, la dependencia de la DHAP limita las moléculas que se pueden obtener utilizando las aldolasas como biocatalizadores, pues sólo es posible variar la mitad de la molécula correspondiente al aldehído aceptor, quedando prefijada la parte correspondiente a la DHAP. Dado que ésta es una característica inherente a la naturaleza de las enzimas, durante los últimos años se han desarrollado diversas estrategias que intentan superar esta limitación con respecto a la cetona donadora. Estas estrategias se podrían agrupar en: (a) catalizadores biomiméticos, (b) diseño de enzimas artificiales, (c) búsqueda de nuevas enzimas naturales, y (d) empleo de miméticos de DHAP.

## Nuevos catalizadores biomiméticos

Algunos aminoácidos simples como serina, treonina y, sobre todo la prolina o derivados de la misma, mimetizan la actividad de las aldolasas de clase I, pues son capaces de catalizar la adición aldólica directa de una gran variedad de cetonas donadoras a aldehídos (List *et al.*, 2000; Sakthivel *et al.*, 2001; Xu y Lu, 2008). En este contexto, el organocatalizador actúa como una micro-aldolasa, aportando al mismo tiempo el grupo amino nucleofílico y un carboxilato donador de protones, mediante un mecanismo muy similar al que sucede en el centro activo de las aldolasas de clase I (Gröger y Wilken, 2001; Ramasastry *et al.* 2007) (Figura 6).



**Figura 6.** Mecanismo aceptado actualmente para la reacción aldólica intermolecular catalizada por (S)-prolina entre la acetona y un aldehído. Este comienza con el ataque nucleofílico del grupo amino al donador (A), deshidratación del intermediario amino carbinol (B), desprotonación de la especie imínica formada (C), formación del enlace C-C por ataque nucleofílico de la enamina, (D) y por último la hidrólisis del aldol-iminio formado (E y F) dando lugar al aldol final.

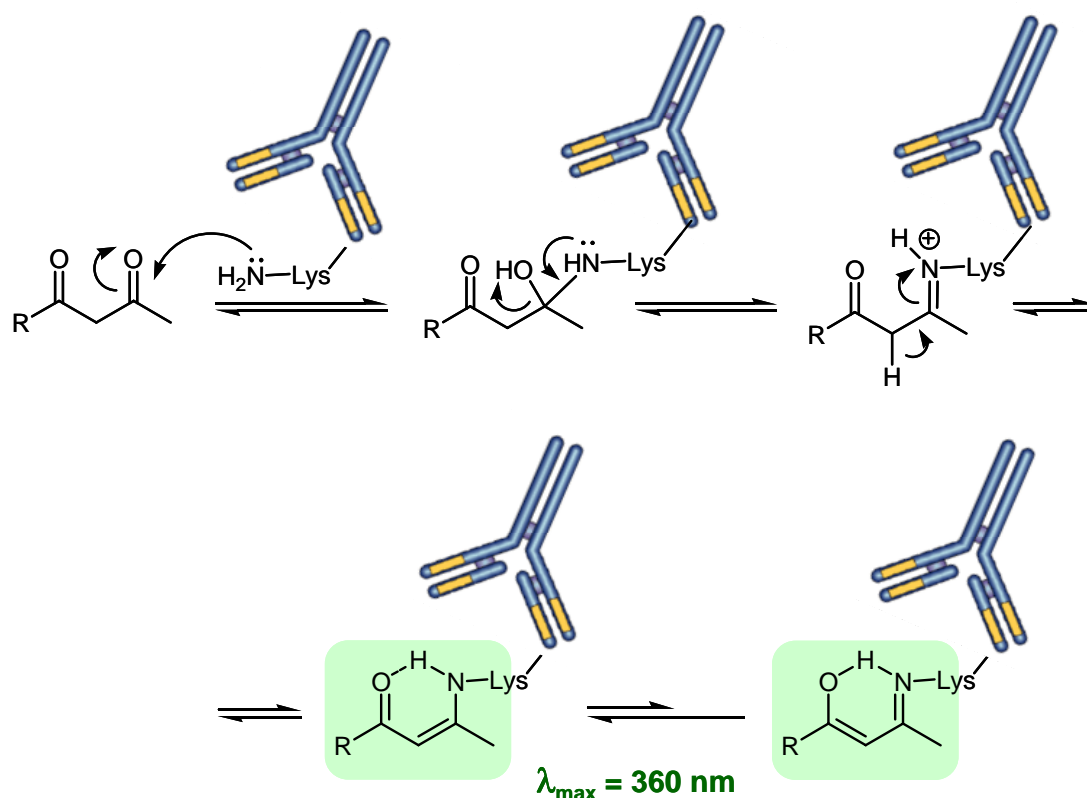
Debido a su eficiencia y sencillez, en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de métodos de adición aldólica basados en organocatalizadores —sobre todo la L-prolina (Enders *et al.*, 2008; Enders y Narine, 2008) —, los cuales han sido optimizados principalmente para utilizar dihidroxiacetona y derivados de la misma (ciclopentanona, ciclohexanona, 2,2-dimetil-1,3-dioxal-5-ona, etc.) como cetona donadora (Markert y Mahrwald, 2008). Uno de las desventajas para la aplicación sintética de estos catalizadores es el menor control de la estereoquímica de la reacción con respecto a las aldolasas, pues en muchos casos depende de los reactivos empleados así como de las condiciones del medio de reacción (temperatura, disolventes y co-disolventes, etc.). Pero su principal limitación es la imposibilidad de llevar a cabo la catálisis en medio acuoso (Mase *et al.*, 2006), lo cual es de gran importancia en el desarrollo de procesos sintéticos más baratos y menos contaminantes.

### **Nuevas enzimas artificiales**

Como se expone en el apartado anterior, determinadas moléculas orgánicas pueden actuar mimetizando el centro activo de las aldolasas para generar una micro-aldolasa. Un paso más en este concepto es intentar dotar a ese micro centro activo de cierta estructura tridimensional para obtener enzimas artificiales que imiten mejor a las aldolasas naturales. En este sentido, durante los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos para lograr inmovilizar la prolina en diversos materiales que faciliten su catálisis o la posibiliten en medio acuoso. Así, se ha inmovilizado sobre materiales mesoporosos (Calderón *et al.*, 2005) o sobre determinadas resinas (Font *et al.*, 2008); se han preparado micromicelas activas en agua mediante unión covalente de restos hidrófobos (Giacalone *et al.*, 2008) o derivados más complejos y polares de prolina (Ramasastry *et al.*, 2008) obteniéndose estructuras ordenadas que pueden asemejarse a pequeñas aldolasas sintéticas.

Una de las estrategias más exitosas para el diseño de enzimas artificiales a la carta es la de los anticuerpos catalíticos (Tramontano y Janda, 1986; Pollack *et al.*, 1986). Anticuerpos catalíticos con actividad aldolasa fueron obtenidos por

primera vez empleando una 1,3-dicetona como hapteno en la inmunización de ratones (Figura 7). Esta molécula mimetiza el estado de transición que tiene lugar en el centro activo de las aldolasas de clase I, permitiendo seleccionar anticuerpos en cuyo sitio de reconocimiento aparece un residuo de lisina, imprescindible para un mecanismo de catálisis tipo enamina (Wagner *et al.*, 1995). Dichos anticuerpos son capaces de catalizar la adición aldólica de una gran variedad de aldehídos y cetonas en medio acuoso, actuando como miméticos realmente eficaces de las aldolasas naturales, aunque con un menor grado de control en la estereoquímica de la reacción (Barbas *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Mecanismo de inmunización reactiva para la obtención de anticuerpos catalíticos con actividad aldolasa. Inicialmente se forma una carbinolamina, seguida de una deshidratación que da lugar a un catión iminio y de una tautomerización que da lugar a la enamina. El anticuerpo con actividad aldolasa puede seleccionarse por absorbancia a 360 nm.

Otra aproximación desarrollada recientemente consiste en utilizar péptidos sintéticos como miméticos de aldolasas. Estos péptidos son capaces de

catalizar adiciones aldólicas gracias al grupo amino de una lisina reactiva, situada en uno de sus extremos, que es necesario para la catálisis mediante un mecanismo tipo enamina (Tanaka *et al.*, 2005). Estos catalizadores son una minimización del enzima natural, reduciendo la larga cadena polipeptídica de la aldolasa a un polipéptido de, como mucho 25 residuos. Evidentemente este pequeño péptido carece de la amplia capacidad de plegamiento de las aldolasas, y tiene una habilidad limitada de adoptar estructuras tridimensionales bien definidas que favorecen la catálisis. Esto se manifiesta en que, aun siendo capaces de catalizar reacciones aldólicas con una amplia variedad de aldehídos y cetonas, la capacidad catalítica de estos enzimas artificiales es baja, con constantes cinéticas pobres —eficiencias catalíticas menores de  $30 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ — en comparación con las aldolasas naturales (Tanaka *et al.*, 2005).

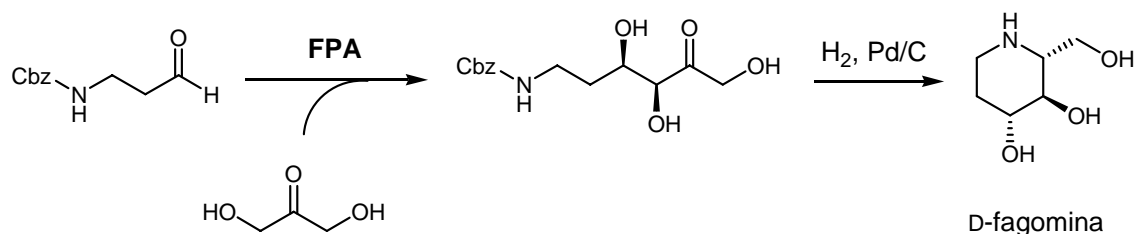
Otra posibilidad para obtener aldolasas no dependientes de DHAP consiste en aplicar estrategias de Evolución Dirigida que permitan modificar la especificidad de sustrato de las enzimas (Tracewell y Arnold, 2009). La evolución dirigida es una potente técnica biotecnológica desarrollada durante los últimos años que permite imitar a la evolución a escala temporal de laboratorio (Valetti y Gilardi, 2004; Bershtein y Tawfik, 2008). Esta técnica presenta ventajas con respecto a los métodos racionales en ingeniería de proteínas, que muchas veces se ven limitados como consecuencia del escaso conocimiento actual de las relaciones entre estructura y función (Antikainen y Martin, 2005; Gerlt y Babbitt, 2009). Son varios los trabajos en evolución dirigida que demuestran que los cambios que alteran la selectividad de las proteínas suelen estar localizados lejos del centro activo, lo cual indica que pequeñas diferencias a lo largo de la proteína pueden tener un impacto impredecible en la actividad (Wada *et al.*, 2003; Van Loo *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2005; Zumarraga *et al.*, 2007). Aunque esta técnica se ha aplicado con éxito a otras familias de aldolasas (Bolt *et al.*, 2008), solo existe un trabajo en el cual se logra obtener una aldolasa independiente de DHAP a partir de la Rha-1PA de *E. coli* (Sugiyama *et al.*, 2007b). No obstante los resultados obtenidos son todavía muy preliminares.



En los últimos años, gracias al enorme desarrollo de los métodos computacionales es posible el diseño *de novo*, mediante complejos algoritmos, de centros activos con la composición y disposición de residuos adecuada para la biocatálisis (Looger *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito el diseño computacional y posterior obtención de varias enzimas con actividad aldolasa (Jiang *et al.*, 2008). Aunque su capacidad catalítica es muy limitada, este hallazgo supone un punto de partida prometedor para el diseño de nuevas aldolasas independientes de DHAP, sobre todo considerando los últimos avances que combinan técnicas computacionales y de Evolución Dirigida (Gerlt y Babbitt, 2009).

### Nuevas enzimas naturales

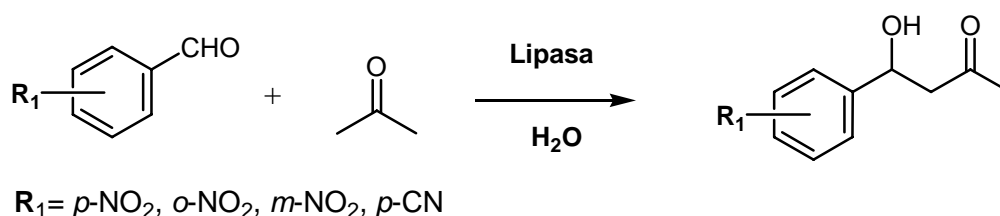
Una vía alternativa al uso de DHAP es el empleo de enzimas que no necesiten DHAP como sustrato donador. Recientemente se ha descrito una fructosa-6-fosfato aldolasa (FPA), una nueva aldolasa tipo I, que cataliza la adición aldólica de DHA a gliceraldehído-3-fosfato (Schürmann y Sprenger, 2001). Además, esta enzima tolera otros aceptores no fosforilados generando la misma estereoquímica que la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (3*S*,4*R*) (Schürmann *et al.* 2002). Aunque, de momento, sólo se ha encontrado esta estereoquímica dentro de un posible grupo de aldolasas dependientes de DHA, esta enzima ha demostrado su aplicabilidad en síntesis de compuestos como la D-fagomina (Castillo *et al.*, 2006) y otros iminociclitoles (Sugiyama *et al.*, 2007a, Concia *et al.*, 2009) (Figura 8).



**Figura 8.** Aplicabilidad de la fructosa-6-fosfato aldolasa (FPA) en la síntesis de D-fagomina.

Otra posibilidad consiste en explotar la promiscuidad catalítica mostrada por

determinados enzimas naturales para catalizar adiciones aldólicas. La promiscuidad catalítica puede definirse como la habilidad de una enzima de catalizar más de una transformación química (Kazlauskas, 2005; Bornscheuer y Kazlauskas, 2004) y es un concepto que en los últimos años ha adquirido gran importancia por sus implicaciones en diferentes campos de la enzimología, como la biocatálisis, ingeniería enzimática y evolución de enzimas (Khersonsky *et al.*, 2006; Hult y Berglund, 2007; Nobeli *et al.*, 2009). En un reciente trabajo se ha descrito que la lipasa de páncreas porcino (PPL), un enzima hidrolasa, tiene la habilidad de catalizar la adición aldólica entre varias cetonas derivadas de DHA y una serie de aldehídos aromáticos (Li *et al.*, 2008) (Figura 9).



**Figura 9.** Reaccion aldólica catalizada por lipasa en presencia de agua.

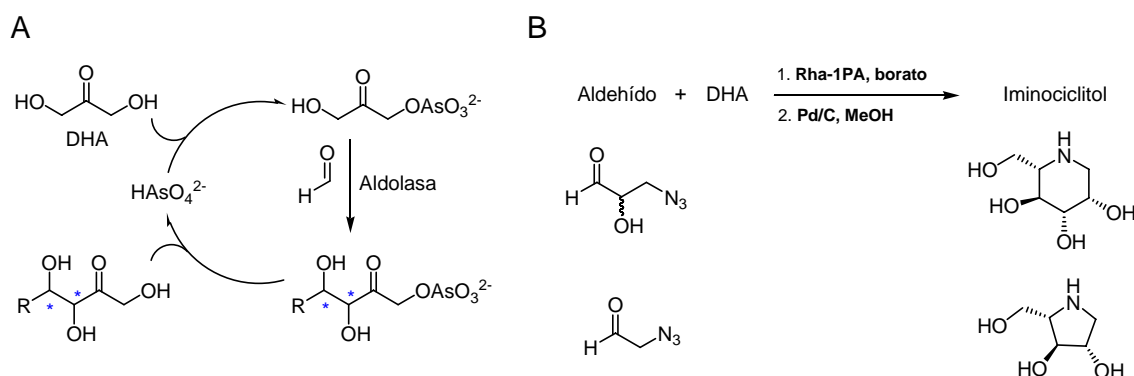
Las adiciones aldólicas catalizadas por esta lipasa alcanzaron rendimientos y excesos enantioméricos aceptables en reacciones en presencia de agua, pero no en medio acuoso, donde no funcionan (el máximo rendimiento se logra con un porcentaje de agua en torno al 20%). En el mismo trabajo se describe la promiscuidad de otras lipasas, como CAL-B, para catalizar adiciones aldólicas, aunque con mucha menor eficiencia que PPL (Li *et al.*, 2008) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad catalítica y estereoselectividad de la reacción aldólica entre 4-nitrobenzaldehído y acetona, catalizada por 20 mg de distintas lipasas.

Lipasa	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	Exceso enantiomérico (%)
PPL	144	96,4	14,7
MJL	24	14,5	12,9
CAL-B	24	2,3	9,4
MML	24	9,8	9,6

## Miméticos de DHAP

Una de las alternativas a la utilización de DHAP es el uso de arsenatos (Drueckhammer *et al.*, 1989; Schoevaart *et al.*, 2001) y vanadatos (Crans *et al.*, 1992) de DHA, formados *in situ*, que actúan como miméticos del éster de fosfato (Figura 10A).



**Figura 10.** (A) Empleo de arsenatos como miméticos de DHAP; (B) Síntesis de iminociclitales catalizada por Rha-1PA en presencia de borato.

La aplicabilidad sintética de este tipo de compuestos está limitada por su toxicidad, que elimina la idea de química verde de los procesos enzimáticos, y la posible incompatibilidad redox del vanadato con los componentes del medio de reacción. Más recientemente se ha descrito la utilización de borato como mimético del éster de fosfato de la DHA (Sugiyama *et al.*, 2006). Aunque, por el momento, sólo han demostrado la aplicabilidad del borato-mimético con Rha-1PA, su utilización en síntesis de iminociclitales permite evitar el empleo de DHAP y simplifica la síntesis eliminando el tratamiento con fosfatasa ácida para defosforilar el aldol (Figura 10B).

A pesar de la variedad de estrategias alternativas a las aldolasas dependientes de DHAP, ninguna de ellas puede compilar con éxito su gran capacidad de catálisis en medios acuosos, el alto control de la estereoquímica que mantienen en las reacciones que catalizan, y la enantioselectividad de las cuatro enzimas pertenecientes a esta familia (Gijzen *et al.*, 1996; Fessner, 1998; Henderson y Toone, 1999; Sukumaran y Hanefeld, 2005).

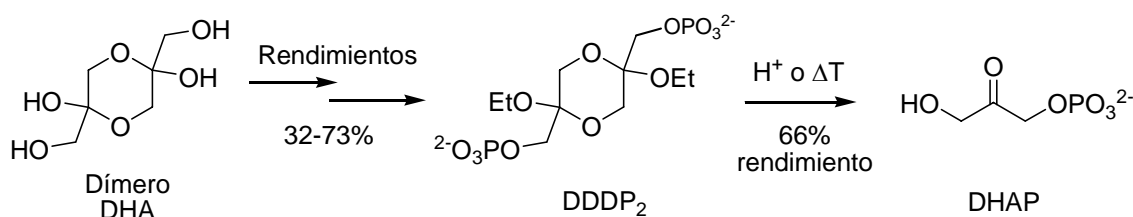
## Estrategias para la síntesis eficaz de DHAP

La DHAP es un compuesto lábil a pH neutros y básicos, situándose su vida media en este rango de pH entre las 3 horas —a 37 °C— y las 30 horas —a 25 °C— (Hettwer *et al.*, 2002; Suau *et al.*, 2006). Dado que este rango de pH y temperatura es el óptimo para la actividad de las aldolasas, la inestabilidad de la DHAP es un importante problema para su aplicación sintética y condiciona enormemente su obtención y almacenamiento, siendo la principal responsable de su alto precio (Sigma-Aldrich: 4.100 €/g) y baja disponibilidad. Dado que este compuesto de tres carbonos no solo es de utilidad en condensaciones aldólicas sino que es una pieza básica en multitud de reacciones de síntesis orgánica (Enders *et al.*, 2005; Enders *et al.*, 2008; Enders y Narine, 2008), es importante contar con estrategias sintéticas eficaces que pueden ser: (a) químicas, o (b) enzimáticas.

### Síntesis química de DHAP

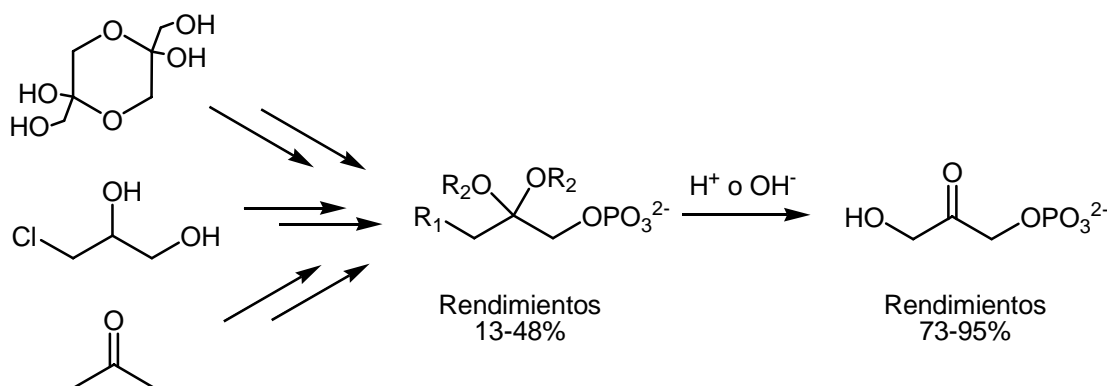
Debido a las distintas funcionalidades presentes en la DHAP, la mayor parte de sus rutas de síntesis química suelen ser procesos que incluyen diversos pasos de protección/desprotección, suelen tener costes elevados y utilizan reactivos tóxicos en muchos casos, lo que limita su aplicación. En general, las rutas sintéticas de DHAP se pueden agrupar en tres bloques en función del precursor de DHAP hacia el que se dirigen: el dímero cíclico DDDP<sub>2</sub> (2,5-dietoxi-*p*-dioxan-2,5-dimetanol-O-2<sup>1</sup>-O-5<sup>1</sup>-bisfosfato), una serie de acetales fosforilados monoméricos o el dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato.

Existen distintas rutas descritas en bibliografía para la síntesis del precursor DDDP<sub>2</sub> (Colbran *et al.*, 1967; Effenberg y Straub, 1987; Pederson *et al.*, 1991; Jung *et al.*, 1994). Todas ellas llegan al precursor con rendimientos entre 32-74%. Además, su posterior hidrólisis térmica o por acidificación para la obtención final de DHAP tiene rendimientos moderados, de hasta un 66% (Figura 11).



**Figura 11.** Síntesis química de DHAP a través del precursor DDDP<sub>2</sub>.

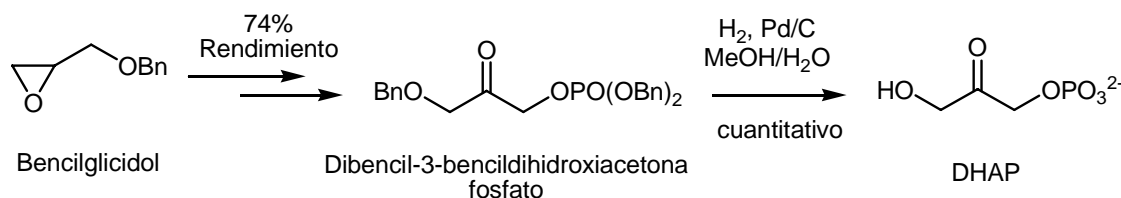
Los acetales fosforilados monoméricos se pueden obtener en varios pasos a partir de 3-cloro-1,2-propanodiol (Ballou y Fischer, 1956), acetona (Valentin y Bolte, 1995; Gefflaut *et al.*, 1997), o el dímero de dihidroxiacetona (Ferroni *et al.*, 1999; Charmantray *et al.*, 2004). En estos casos, el rendimiento global de la obtención del precursor es pobre, entre el 13-48%. Como en el caso anterior, la obtención de la DHAP final se consigue por hidrólisis ácida o básica, según el precursor. En este caso, el paso final de hidrólisis tiene rendimientos entre buenos y excelentes (73-95%) (Figura 12).



**Figura 12.** Síntesis química de DHAP a través de acetales fosforilados.

Recientemente se ha descrito una ruta sintética para formar el dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato, precursor de la DHAP, a partir de bencilglicidol racémico (Meyer *et al.*, 2006). El interés de esta ruta radica en que es una síntesis a gran escala con un rendimiento global del 74%, el reactivo de partida es barato y el precursor de DHAP generado es estable. La DHAP se obtiene posteriormente mediante hidrogenólisis con rendimientos cuantitativos. Como

inconvenientes, este método requiere cantidades estequiométricas de ácido de Lewis (CuI, NMO) que es difícil de preparar, utiliza un catalizador caro como el TPAP y el bencilglicidol de partida no es comercial (Figura 13).



**Figura 13.** Síntesis química de DHAP a través de dibencil-3-bencilhidroxiacetona fosfato.

Aunque se ha demostrado que estos sistemas sintéticos dan lugar a preparaciones de DHAP directamente aplicables a reacciones catalizadas por aldolasas, todas ellas son rutas en varios pasos, con rendimientos globales relativamente bajos, con distintos pasos de purificación y que además necesitan utilizar reactivos caros y/o tóxicos.

### Síntesis enzimática de DHAP

Existen varios métodos de síntesis enzimática de DHAP alternativos a la síntesis química. A diferencia de los métodos químicos, todos ellos buscan una estrategia de formación y utilización *in situ* con aldolasas dependientes de DHAP (estrategias *one-pot*), lo cual permite eliminar los pasos de purificación y solucionar el problema de inestabilidad del sustrato (Schümperli *et al.*, 2007). Como contrapartida, la mayor complejidad del crudo de reacción resultante dificulta enormemente la purificación de DHAP, por lo que no puede ser empleada en otro tipo de reacciones que requieran un mayor refinado del producto inicial para su correcta ejecución. La DHAP se puede formar a partir de sucrosa, un disacárido barato y fácilmente accesible, utilizando un sistema enzimático que implica ocho enzimas diferentes funcionando simultáneamente (Fessner y Walter, 1992). Este sistema es una reconstrucción *in vitro* de la glicolisis donde la sucrosa se escinde enzimáticamente en glucosa y fructosa. A

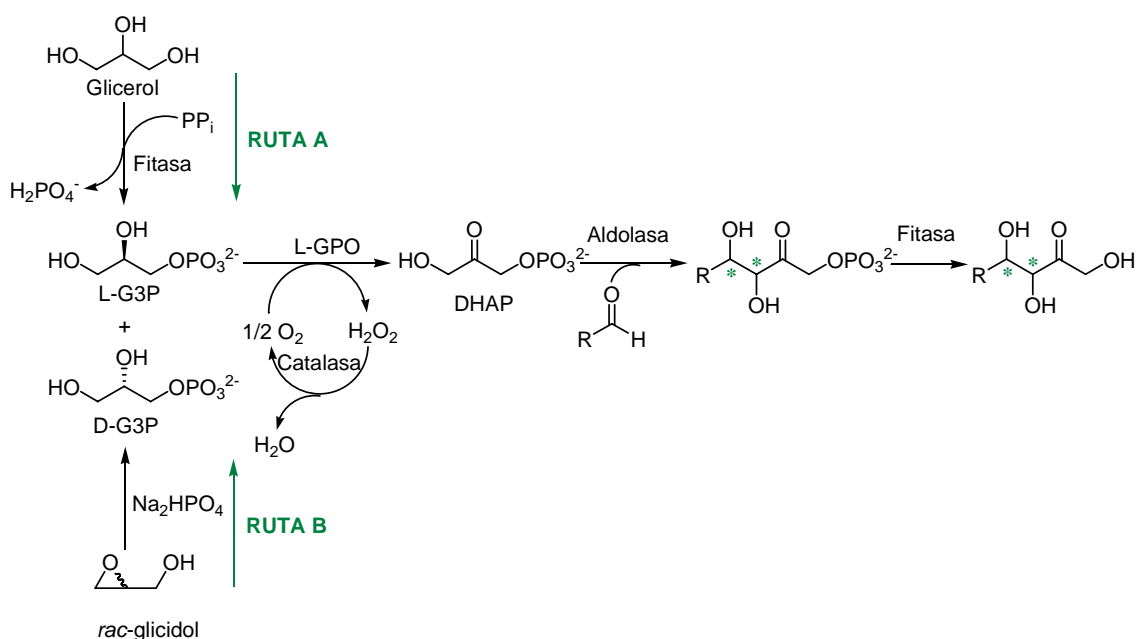
partir de la fructosa se forman secuencialmente fructosa 6-fosfato, fructosa 1,6-bisfosfato y finalmente gliceraldehído y DHAP (Figura 1). Este método multienzimático se basa en uno anterior muy similar para obtener DHAP a partir de fructosa 1,6-bisfosfato (Bednarski *et al.*, 1989), pero resuelve el problema de partir de este sustrato fosforilado que es caro y menos accesible que la sucrosa. El principal inconveniente de este sistema es la gran cantidad de enzimas que requiere para su aplicación y la complicación de integrar la síntesis *in situ* de DHAP a la acción de las aldolasas en estrategias *one-pot*, por la posibilidad de reacciones cruzadas que afecten al rendimiento final (por ejemplo, la formación de D-gliceraldehído-3-fosfato, sustrato natural de la fructosa-1,6-bisfosfato y tagatosa-1,6-bisfosfato, por la presencia de triosafofosfato isomerasa).

Una alternativa menos compleja es la preparación de DHAP por oxidación del L-glicerol-3-fosfato (L-G3P) catalizada por la L-glicerofosfato oxidasa (L-GPO) (Fessner y Sinerius, 1994). Esta reacción tiene lugar con consumo de oxígeno y generación de peróxido de hidrógeno. Para evitar su acumulación es necesario añadir catalasa, que regenera el oxígeno consumido (Figura 12). Se han investigado varias L-GPO de distintos microorganismos, pero todas ellas presentan inhibición por producto a altas concentraciones. Además, las condiciones oxidantes pueden favorecer la formación de polímeros de DHAP. Para evitar este inconveniente, Fessner y Sinerius (1994) acoplaron la oxidación del L-glicerol-3-fosfato a la reacción aldólica catalizada por fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de músculo de conejo (RAMA) y por Rha-1PA de *E. coli*. El principal problema que plantea el acoplamiento de este sistema de generación de DHAP con la reacción aldólica radica en la estabilidad del aldehído. Las condiciones del medio de reacción son altamente oxidantes y en estas condiciones el aldehído puede reaccionar dando lugar al correspondiente ácido.

Otro de los inconvenientes de este sistema enzimático es que requiere como producto de partida L-G3P, un compuesto no comercial. Para solventar este problema se incorporó un paso previo de formación *in situ* de D,L-G3P mediante fosforilación de glicerol, catalizada por la fosfatasa fitasa (Schoevaart *et al.*, 1999). El punto clave de esta ruta es la utilización de la fitasa de *Aspergillus ficuum*, que es una enzima barata y accesible que además requiere pH ácido

para funcionar mientras que a pH neutros se inactiva. Así es posible llevar a cabo la reacción multienzimática completa mediante modulación de la actividad fosforilasa con el pH. (Figura 14- A).

Más recientemente, el sistema desarrollado por Fessner y Sinerius se ha acoplado a la formación *in situ* de D,L-G3P por apertura química del anillo epóxido del *rac*-glicidol con fosfato (Charmantray *et al.*, 2006) (Figura 14- B).



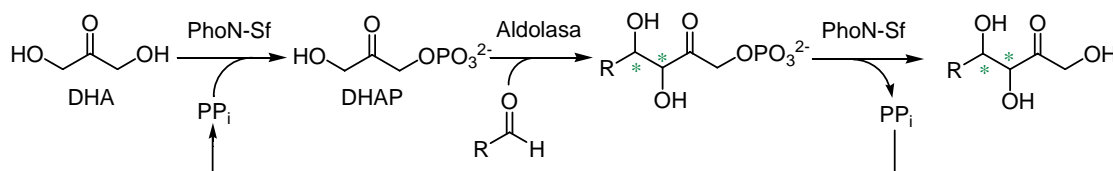
**Figura 14.** Rutas enzimáticas de síntesis de DHAP basadas en el empleo de glicerolfosfato oxidasa (L-GPO) acoplado a la reacción aldólica y a la desfosforilación del aducto formado.

Por otra parte, Wever y colaboradores (van Herk *et al.*, 2006) han descrito una reacción en cascada para la formación *in situ* de DHAP utilizando la fosfatasa ácida de *Shigella flexneri* (PhoN-Sf) y pirofosfato inorgánico ( $\text{PP}_i$ ) como donador de fosfato (Figura 15).

Este sistema tiene la peculiaridad de aprovechar la reversibilidad de la fosfatasa para el reciclado del grupo fosfato. Así, la fosfatasa empieza catalizando la fosforilación de la DHA y a continuación desfosforila el aldol fosfato formado en la reacción aldólica. El principal inconveniente que presenta este método, como los propios autores reconocen, es que necesita partir de



grandes cantidades de DHA y  $\text{PP}_i$  para desplazar el equilibrio hacia la formación de DHAP y no hacia su desfosforilación.



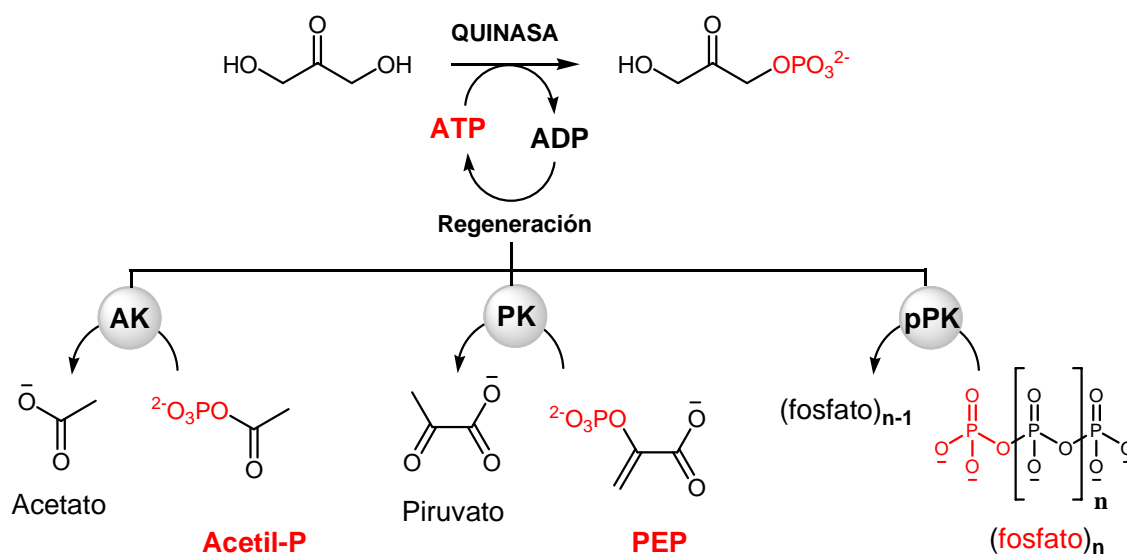
**Figura 15.** Sistema multienzimático para la obtención de aldoles con formación *in situ* de DHAP a partir de DHA y  $\text{PP}_i$  y con reciclado de pirofosfato.

Otra herramienta empleada para la obtención enzimática de DHAP a partir de DHA es la aplicación de enzimas quinasas. En general, estos métodos de síntesis enzimática de DHAP requieren la transferencia de un grupo fosfato desde el donador ATP, que posee grupos fosfoéster de alta energía, hasta un precursor estable no fosforilado como es la DHA. Debido al elevado coste del ATP y a que el ADP formado suele actuar como inhibidor de estos enzimas, la formación de DHAP debe llevar acoplado un sistema de regeneración de ATP que posibilite su utilización en concentraciones subestequiométricas. Los sistemas de regeneración más importantes son: (i) la regeneración de ATP a partir de acetil-fosfato catalizada por acetato quinasa; (ii) la regeneración a partir de fosfoenolpiruvato catalizada por piruvato quinasa; (iii) la regeneración a partir de polifosfato inorgánico catalizada por polifosfato quinasa (Figura 16).

La fosforilación de DHA catalizada por quinasas con ATP como donador de fosfato es una aproximación descrita por primera vez utilizando la glicerol quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Wong y Whitesides, 1983). La baja especificidad de sustrato de la glicerol quinasa permite la fosforilación de DHA, llegando incluso a escalas de reacción de 1 mol (Crans y Whitesides, 1985a,b).

Una alternativa ventajosa a la glicerol quinasa son las dihidroxiacetona quinasas (DHAKs) dependientes de ATP. La primera DHAK empleada en síntesis de DHAP fue obtenida de la levadura *Candida boidinii*, revelándose mucho más específica y eficaz que la glicerol quinasa en la fosforilación de DHA (Yanase *et al.*, 1995). Posteriormente se observó que la DHAK isoenzima I de

*Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354 es un buen biocatalizador para la producción de DHAP acoplada a la regeneración *in situ* de ATP mediante una acetato quinasa (Itoh *et al.*, 1999). Las dihidroxiacetona quinasas son, en general, enzimas con una alta especificidad de sustrato por la DHA, una actividad específica considerable (10-20 U/mg de proteína) y que muestran valores de  $K_M$  por debajo de 100  $\mu\text{M}$ , lo cual hace de estos enzimas especialmente interesantes como biocatalizadores para la síntesis de DHAP (Schümperli *et al.*, 2007). La regeneración del cofactor ATP es imprescindible para la aplicación sintética de este tipo de quinasas con el fin de evitar la acumulación de ADP, un potente inhibidor competitivo en la fosforilación, y favorecer el uso de cantidades subestequiométricas de un compuesto caro como es el ATP (Figura 16).



**Figura 16.** Fosforilación de DHA catalizada por quinasas con consumo de ATP. Sistemas de regeneración de ATP. (AK: acetato quinasa; PK: piruvato quinasa; pPK: polifosfato quinasa).

La principal ventaja del sistema de regeneración basado en el uso de la acetato quinasa es que el acetil-P es fácil de sintetizar a partir de ácido fosfórico y anhídrido acético (Crans y Whitesides, 1983) y que el acetato sódico que se genera como producto es un compuesto volátil y medioambientalmente compatible. Por su parte, el fosfoenol piruvato es estable pero su síntesis es

cara y tediosa. Además, el piruvato generado durante la regeneración de ATP es un inhibidor competitivo de quinasas, lo que limita su aplicación (Hirschbein *et al.*, 1982). Sin duda, el más estable y barato de los tres donadores de fosfato para la regeneración del ATP es el polifosfato, un polímero lineal de fosfatos unidos mediante enlaces fosfoéster de alta energía. La utilización de la polifosfato quinasa en regeneración de ATP está limitada por la capacidad de este enzima para fosforilar nucleósidos bifosfato, que ronda el 50% en el caso del ADP (Noguchi y Shiba, 1998). Para poder simplificar la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP, estos sistemas de regeneración de ATP se deben acoplar a la síntesis de DHAP y a la reacción aldólica, si es factible.

## DIHIDROXIACETONA QUINASAS

Como hemos comentado anteriormente, las DHAKs son enzimas que catalizan la formación de un enlace fosfoéster entre una molécula de fosfato (unida mediante enlace de alta energía al sustrato donador de fosfato) y cualquiera de los dos grupos hidroxilo de la 1,3-dihidroxiacetona libre (el sustrato aceptor de fosfato), para dar lugar al intermedio glucolítico DHAP.

## Filogenia y estructura de las DHAKs

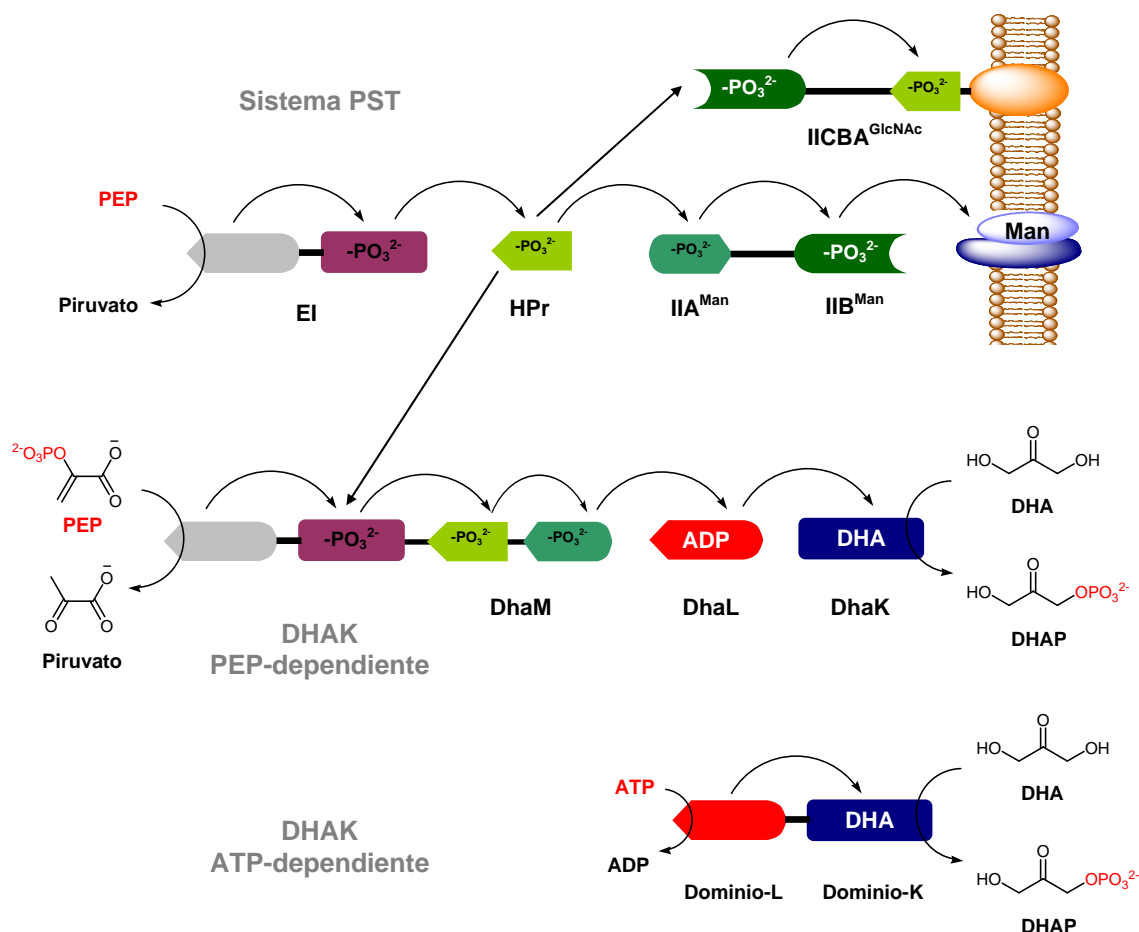
A grandes rasgos, se pueden clasificar a las DHAKs en dos grupos, en función del donador del grupos fosfato de alta energía que utilicen: i) las ATP-dependientes, que utilizan ATP como donador y ii) las PST-dependientes, que emplean fosfo-proteínas del sistema bacteriano carbohidrato: fosfotransferasa fosfoenolpiruvato-dependiente (PST), siendo el fosfoenolpiruvato el primer donador (Siebold *et al.*, 2001; Saier *et al.*, 2005). Las DHAKs están ampliamente distribuidas en los tres reinos. Se pueden encontrar genes que codifican para estas enzimas en prácticamente todos los organismos, tanto eubacterias, levaduras, algas, plantas y animales, incluidos los humanos (Erni *et al.*, 2006).

Las DHAKs ATP-dependientes son las más abundantes, mientras que las DHAKs PST-dependientes son exclusivas de eubacterias, y no se encuentran en ningún otro organismo. Este hecho puede explicarse evolutivamente mediante análisis filogenéticos, pues las DHAKs PST-dependientes comparten un ancestro común ATP-dependiente a partir del cual evolucionaron de forma divergente (Bächler *et al.*, 2005).

Las DHAKs PST-dependientes fueron inicialmente descubiertas en mutantes *pst*, con alteraciones en diferentes proteínas pertenecientes al sistema PST de *E. coli* (Jin *et al.*, 1983). La posterior sobre-expresión y purificación de la DHAK de *E. coli* reveló que la enzima se compone de dos subunidades catalíticas: DhaK y DhaL, a las cuales se añade una tercera subunidad donadora de grupos fosfato: DhaM (Beutler *et al.*, 2001). Esta subunidad DhaM es una fosfoproteína que utiliza el fosfoenolpiruvato como donador para fosforilar una de sus histidinas, ya sea directamente o a través de las proteínas transportadoras de fosfato HPr y EI, pertenecientes al sistema bacteriano PST (Postma *et al.*, 1996) (Figura 17). La subunidad DhaM-fosforilada interacciona con las subunidades catalíticas DhaL, que utiliza el ADP como cofactor intermediario en la transferencia del fosfato (Bächler *et al.*, 2005), y DhaK, en donde se encuentra el sitio de unión de la DHA, que es el aceptor final del grupo fosfato transferido (Gutknecht *et al.*, 2001) (Figura 17).

Tanto DhaK como DhaL de *E. coli* han sido cristalizadas y su estructura tridimensional obtenida mediante difracción de rayos-x (Siebold *et al.*, 2003b; Oberholzer *et al.*, 2006). Más recientemente, una segunda DHAK PST-dependiente, procedente de la bacteria *Lactococcus lactis*, ha sido resuelta cristalográficamente, pero en esta ocasión se ha logrado obtener la estructura de la subunidad DhaM, tanto libre como unida a la DhaL (Zurbriggen *et al.*, 2008). Estos nuevos datos revelan una enorme similitud a nivel de estructura cuaternaria entre las subunidades DhaK y DhaL presentes en los dos microorganismos, así como entre la subunidad DhaM de *L. lactis* y el dominio EIIA<sup>Man</sup> del transportador de manosa del sistema PST (Kinch *et al.*, 2005), explicando definitivamente la relación entre los dos sistemas enzimáticos. Las DHAKs PST-dependientes son enzimas hetero-oligoméricas, lo que las hace

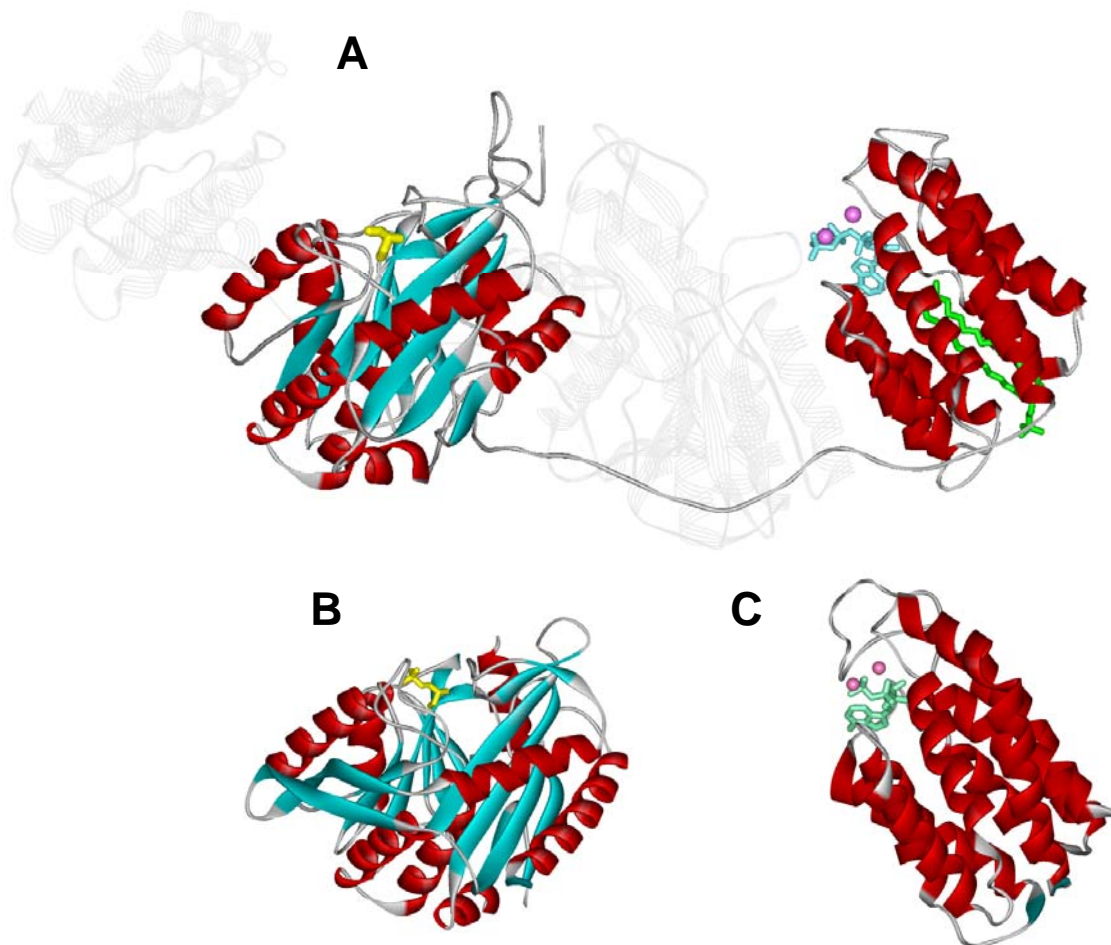
poco atractivas para su utilización en biocatálisis, debido a la dificultad de purificación y manipulación de tres subunidades diferentes.



**Figura 17.** Esquema del funcionamiento de las dihidroxiacetona quinasas ATP y PEP dependientes, y su relación con proteínas pertenecientes al sistema PST bacteriano.

Por el contrario, las DHAKs ATP-dependientes conocidas hasta el momento son homodiméricas y poseen en la misma cadena polipeptídica los sitios catalíticos para DHA y ATP, lo cual ha suscitado interés para su utilización en síntesis enzimática de DHAP (Itoh *et al.*, 1999). El paradigma para el estudio de este tipo de quinasas es la DHAK de la bacteria *Citrobacter freundii*. En la cepa DMS 30040 de este microorganismo, el regulón *dha* completo (donde se encuentra el gen que codifica para la DHAK) ha sido clonado y caracterizado a nivel molecular (Daniel y Gottschalk, 1991; Daniel *et al.*, 1995). Las propiedades cinéticas y el mecanismo del correspondiente enzima han sido descritas

(Garcia-Alles *et al.*, 2004), y su estructura cristalográfica en conjunción con el sustrato DHA y un análogo no hidrolizable de ATP ha sido resuelta mediante difracción de rayos-x (Siebold *et al.*, 2003a). Esta estructura revela que la enzima está constituida por dos dominios: el dominio-K, en el cual se encuentra el sitio de unión de la DHA, y el dominio-L, donde se localiza el sitio de unión del ATP. En éste homodímero, el dominio-K de una subunidad se enfrenta con el dominio-L de la otra para la catálisis y viceversa, dando lugar a una enzima con dos centros activos (Figura 18).



**Figura 18.** Estructura de la DHAK de *C. freundii* (A) y de las subunidades DhaK (B) y DhaL (C) de *E. coli*. Uno de los monómeros de la enzima de *C. freundii* se muestra en gris y el otro coloreado por estructura secundaria. En modelo *ball and sticks* se muestran el ATP (azul), ADP (verde claro), DHA (amarillo), fosfolípido (verde oscuro) y los iones  $Mg^{2+}$  (morado).

Dominio-K y dominio-L presentan una homología en secuencia del 36% y 28% con las subunidades DhaK y DhaL respectivamente, de la DHAK de *E. coli*

así como una gran similitud a nivel estructural.

Sin embargo, la DHAK de *C. freundii* es una quinasa atípica, precisamente debido a su peculiar estructura. Es la única quinasa conocida que tiene un dominio de unión a ATP formado únicamente por  $\alpha$ -hélices (Siebold *et al.*, 2003a). En concreto, el dominio-L de unión a ATP consta de ocho  $\alpha$ -hélices anfipáticas dispuestas espacialmente en forma de barril, con los residuos más apolares situados hacia el interior, formando un bolsillo hidrofóbico donde se sitúa un lípido; concretamente el fosfolípido 2-mirístico(C14)-3-palmítico(C16) (Figura 18). La función de éste ácido graso es, hasta el momento desconocida, aunque parece que su eliminación o sustitución con surfactantes no afecta a su actividad, por lo que su papel podría ser estructural o auxiliar durante el plegamiento de la proteína. No acaban aquí las peculiaridades de esta enzima, pues la unión del ATP en el sitio catalítico se realiza superficialmente, en la parte superior del barril de  $\alpha$ -hélices, y no en el interior de un bolsillo específico como suele ser habitual en el resto de quinastas. Además, el ATP se une coordinándose a dos iones divalentes  $Mg^{2+}$  en lugar de uno, que neutralizan completamente su carga negativa. Por todas estas peculiaridades, la DHAK de *C. freundii* constituye en si misma un grupo en la clasificación de las quinastas, siendo hasta el momento la única con estas características (Cheek *et al.*, 2005).

## Función biológica de la DHAKs

Como se puede observar, existe un amplio conocimiento a nivel molecular y estructural del las DHAKs, tanto ATP como PST dependientes. Sin embargo, es muy poco lo que se conoce en lo referente a su función biológica.

En determinados casos, su papel metabólico es bien conocido: es uno de los enzimas implicados en la disimilación anaeróbica del glicerol en microorganismos capaces de crecer empleando éste alcohol como fuente de carbono y energía. La participación de la DHAK en el catabolismo anaerobio del glicerol es bien conocida en bacterias (Bouvet *et al.*, 1995), especialmente en *C. freundii* (Daniel *et al.*, 1995), *Klebsiella pneumoniae* (Forage y Foster, 1982;

Wang *et al.*, 2003) y *Clostridium butyricum*, que solo es capaz de asimilar el glicerol mediante esta ruta metabólica (Saint-Amans *et al.*, 2001). En general, las DHAKs implicadas en esta función son ATP-dependientes aunque recientemente se ha descrito que algunas PST-dependientes pueden participar en el catabolismo del glicerol, como es el caso de *E. coli* (Gonzalez *et al.*, 2008). También es conocida en levaduras capaces de crecer en glicerol como *Schizosaccharomyces pombe* (Gancedo *et al.*, 1986) y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otras (Babel y Hofmann, 1982).

Otra de las funciones de la DHAK se desarrolla en levaduras metilotróficas como *Hansuela polymorpha* (van der Klei *et al.*, 1998) y *Pichia pastoris* (Lüers *et al.*, 1998), donde participa en las rutas metabólicas de asimilación del metanol y detoxificación del formaldehído (Yurimoto *et al.*, 2005). A su vez, algunas de estas levaduras son capaces de crecer en presencia de glicerol empleando la misma DHAK (Babel y Hofmann, 1982).

No obstante, en la mayoría de los casos aún no está clara su función biológica: muchas DHAKs están presentes en organismos que no metabolizan glicerol ni metanol para la obtención de energía, lo cual las descarta como enzimas del metabolismo del carbono (Erni *et al.*, 2006).

Está descrito que la DHA libre es toxica para las células cuando alcanza ciertos niveles: la DHA es altamente reactiva y puede alterar las proteínas mediante reacciones no enzimáticas tipo Maillard (Tessier *et al.*, 2003) que además forman radicales superóxido por auto-oxidación (Benov y Beema, 2003). En este sentido se ha observado en levaduras que las DHAKs están implicadas en detoxificación de DHA libre (Molin *et al.*, 2003a), labor que no es excluyente con su función en el metabolismo del carbono; incluso pueden coexistir diferentes DHAKs en un mismo organismo (Kimura *et al.*, 1998; Molin *et al.*, 2003b; Erni *et al.*, 2006). Esta labor preventiva podría ser una explicación para la amplia distribución de estas quinasas en todos los organismos. Recientemente se ha demostrado que el parásito *Trypanosoma brucei* carece de DHAK en su forma sanguínea, lo cual le hace especialmente sensible a DHA: su crecimiento se inhibe al 50% en presencia de tan solo 1 mM de DHA, una concentración totalmente inocua en mamíferos (Uzcátegui *et al.*, 2007). Este



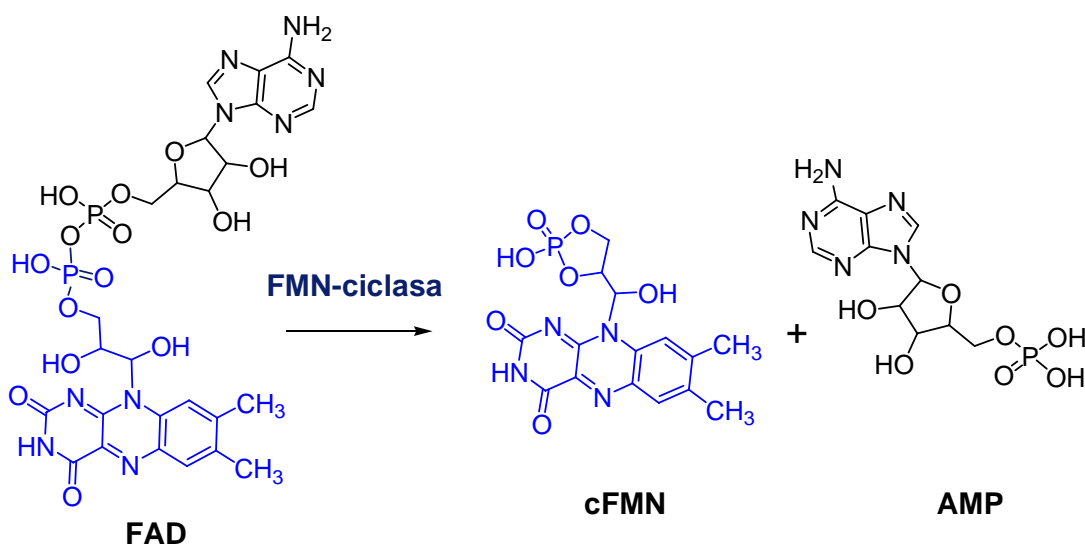
hallazgo respalda el papel protector de las DHAK frente a DHA como una de sus funciones en casi cualquier organismo.

También en levaduras se observó por primera vez un incremento en la expresión de ciertas DHAKs en situaciones de estrés celular, tales como una alta osmolaridad (Rep *et al.*, 2000), choques térmicos (Boy-Marcotte *et al.*, 1999) o presencia de oxidantes en el medio (Gordon *et al.*, 1998), lo cual hace presuponer que esta actividad enzimática está implicada en contrarrestar estos desequilibrios que afectan a la integridad celular. El mecanismo seguido a tal efecto es aún desconocido, aunque recientemente se ha establecido una relación directa entre estos fenómenos y la detoxificación de DHA en la levadura *S. cerevisiae*. Cuando se somete un cultivo de esta levadura a altas concentraciones de DHA, se induce la expresión de sus dos DHAKs, pero también la de otros enzimas implicados en situaciones de estrés químico celular, como disimilación de formaldehído y metabolismo del glutatión (Molin y Blomberg, 2006). En un reciente estudio realizado con la bacteria *Haloferax volcanii* se ha demostrado que, cuando se inhiben específicamente los proteosomas del microorganismo con el compuesto clasto-lactacistina- $\beta$ -lactona (cL $\beta$ L), se induce la expresión de una serie de proteínas, entre las cuales se encuentra la DHAK (Kirkland *et al.*, 2007). Los proteosomas son unas estructuras celulares con actividad proteasa implicadas en una gran variedad de funciones en las células eucariotas, como translación, transcripción, metabolismo, reparación del ADN y control de ciclo celular. Este experimento relaciona a la DHAK con la regulación de proteosoma en bacterias, y apoya la teoría de que podría estar implicada en determinados mecanismos protectores coordinados ante estímulos negativos. Esta función de protección parece que no es exclusiva de levaduras, sino que existen indicios de que también tienen lugar en algunas plantas (Lee *et al.*, 1999).

A pesar de todo, la función biológica real de las DHAKs sigue generando muchas dudas, sobre todo en mamíferos superiores a medida que se van sucediendo nuevos descubrimientos sobre esta peculiar enzima.

Desde este punto de vista es muy interesante el reciente descubrimiento de

que dos FAD-AMP liasas, o simplemente FMN-ciclasas, una humana y otra de rata, poseen un carácter bifuncional pues además de actividad quinasa también son DHAKs (Cabezas *et al.*, 2005). Estas enzimas catalizar la formación de riboflavina 4',5'-fosfato cíclica (cFMN) a partir de FAD, liberando una molécula de adenosina monofosfato (Fraiz *et al.*, 1998; Cabezas *et al.*, 2001), y aunque su función biológica es aún desconocida existen evidencias de formación endógena de cFMN en mamíferos superiores (Canales *et al.*, 2005) (Figura 19). En cuanto a la posible función del cFMN, se especula con que podría ser una flavocoenzima minoritaria en procesos redox, un metabolito intermedio en la degradación del FAD o una molécula implicada en transducción de señales. Las dos actividades quinasa/ciclase fueron co-purificadas en la misma proteína, con una relación de actividades de aproximadamente 1/3, manifestando que se trata de una enzima naturalmente promiscua. El hecho de que determinadas DHAKs sean capaces de dar lugar a un nucleótidos cíclicos podría explicar su amplia distribución en los seres vivos pues muchos de los compuestos de esta familia de moléculas están implicados en mecanismos de trasducción de señales actuando como segundos mensajeros (Galione, 1993; Dumaz y Marais, 2005; Hofmann, 2005).



**Figura 19.** Formación de riboflavina 4',5'-fosfato cíclica (cFMN) a partir de FAD, catalizada por la FMN-ciclasa (FAD-AMP liasa).

Otro sorprendente descubrimiento sobre la DHAK humana revela su implicación en mecanismos reguladores contra la respuesta inmune ante determinadas clases de virus. La infección de células humanas por virus desencadena una serie de respuestas fisiológicas encaminadas a actuar contra el virus en cuestión, inhibiendo su replicación y capacidad de infectar a células vecinas. Una de estas respuestas es la inducción de interferones (IFNs) tipo I, que posibilita la inducción de una serie de genes IFN-estimulados, necesarios para combatir la infección viral, mediante la acción coordinada de múltiples factores de transcripción (Honda y Taniguchi, 2006). El desencadenante de toda esta respuesta inmune para determinados tipos virales (poli(I:C) y picornavirus causantes de encefalomiocarditis) es una enzima con actividad helicasa llamada MDA5, que actúa como biosensor ante ssRNA genómico del virus invasor. Cuando MDA5 detecta restos del virus, pone en marcha una compleja cascada molecular de señalización a través de proteínas-quinasas, que acaba en la inducción de IFNs tipo I (Kato *et al.*, 2006).

Una reciente investigación ha descubierto que la DHAK humana es capaz de interactuar con MDA5 a través de su extremo N-terminal, en el cual se encuentra el dominio-K de unión a DHA, siendo esta interacción no dependiente de su actividad quinasa (Diao *et al.*, 2007). Cuando la DHAK humana se une a MDA5 evita su interacción con las proteínas-quinasas de señalización, interrumpiendo la cascada de señales e inhibiendo la inducción de los genes IFN-estimulados (Diao *et al.*, 2007).

Así pues, la DHAK humana ejerce una regulación negativa *in vivo* sobre la respuesta inmune contra determinados tipos de virus, cuya función podría ser controlar esta respuesta y evitar su expresión cuando no es necesaria (Diao *et al.*, 2007). Este hecho pone de manifiesto que el papel biológico real de las DHAKs no está limitado a una función catalítica (derivada de su actividad quinasa y/o ciclasa), sino que tiene una función adicional no enzimática y posiblemente regulatoria. A este tipo de actividades se les denomina en inglés *moonlighting activities* y permiten diversificar los usos de una proteína funcionando a la vez como biocatalizador y biorregulador, aprovechando las

distintas partes de su estructura cuaternaria (Copley, 2003; Jeffery, 2004; Gancedo y Flores, 2008).

Como se ha mostrado a lo largo de la presente introducción, las DHAKs son enzimas muy interesantes. Su interés no solo se circunscribe a su habilidad para catalizar muy eficientemente la síntesis de DHAP, un sustrato de gran importancia para determinadas aplicaciones en química orgánica, sino que trasciende más allá debido a sus peculiaridades estructurales, catalíticas y funcionales, lo cual incrementa su interés como objeto de estudio detallado. Por todo lo anteriormente mencionado, la presente tesis doctoral trata sobre el diseño de nuevas metodologías sintéticas para la aplicación de aldolasas dependientes de DHAP, basadas en la utilización de la DHAK de *C. freundii* CECT 2646. Dichas metodologías se enmarcan en el campo de la biocatálisis y de la modificación enzimática mediante técnicas de evolución dirigida. Pero además, también se aborda el estudio de esta variante de DHAK desde el punto de vista de su caracterización bioquímica, intentando arrojar un poco de luz a sus funciones biológicas y propiedades bioquímicas.

## OBJETIVOS.

El objetivo global que nos planteamos al iniciar esta Tesis Doctoral fue el de desarrollar nuevos biocatalizadores que mejoraran y facilitaran la aplicación sintética de las aldolasas dependientes de DHAP. Puesto que el mayor inconveniente que presentan estas enzimas es su dependencia de la DHAP, nos centramos en el diseño de un sistema multienzimático que permitiera su obtención *in situ*.

De las distintas alternativas que podían seguirse para la formación enzimática de DHAP, nos pareció que la más directa y que más ventajas presentaba desde el punto de vista biotecnológico era la fosforilación de la DHA. Por lo tanto, el objetivo de la Tesis se centró en la obtención y estudio integral como biocatalizador de una enzima que permitiera la fosforilación de DHA, en concreto la DHA quinasa de *Citrobacter freundii* CECT 4626.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos particulares:

- Clonaje, sobre-expresión y caracterización bioquímica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.
- Diseño, desarrollo y optimización de un sistema multienzimático acoplado aldolasa/quinasa para la formación de enlaces C-C.
- Estudio de la aplicabilidad sintética de este sistema multienzimático.
- Iniciar un programa de Evolución Dirigida de esta proteína tendente a modificar su especificidad por el compuesto donador de grupos fosfato.



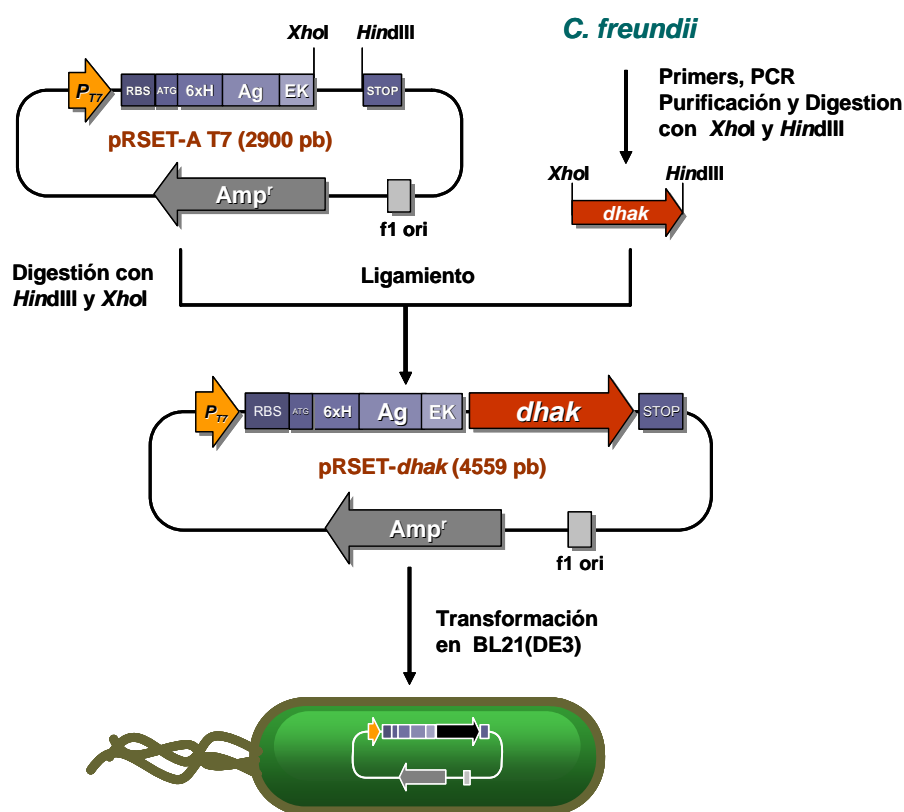
## RESULTADOS.

### OBTENCIÓN DE LA DHAK DE *C. freundii* CECT 4626

#### Clonaje y análisis de la secuencia

Utilizando como referencia la secuencia nucleotídica de la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 (*GeneBank*: U09771) se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación del gen *dhak*, incorporando dianas de restricción para los enzimas *Xho*I y *Hind*III. A partir de ADN genómico de la cepa CECT 4626 de *C. freundii* se amplificó mediante PCR un fragmento de aproximadamente 1,6 Kb correspondiente al tamaño del gen. Tanto el gen como el vector pRSET-A fueron purificados, digeridos con los mencionados enzimas, y sometidos al ligamiento de sus extremos cohesivos para obtener la construcción pRSET-*dhak* (Figura 1R). La construcción obtenida se secuenció para verificar que el fragmento incorporado correspondía realmente al gen *dhak*.

Los datos obtenidos revelaron que existían notables diferencias entre la secuencia nucleotídica obtenida y la previamente descrita. La secuencia amplificada de la cepa CECT 4626 contiene 117 nucleótidos alterados con respecto a la cepa DMS 30040 de *C. freundii* (Figura 2R). Con el fin de descartar que las mutaciones observadas se produjesen durante el proceso de amplificación por PCR, la secuenciación se realizó en seis colonias de transformantes distintas, seleccionadas al azar, obteniéndose idéntico resultado.



**Figura 1R.** Esquema del clonaje del gen *dhak* a partir de la cepa CECT 4626 de *C. freundii*.

```

ATGTCCTCAATTCTTTTAACTCAACGCACCCATCTCTGAGCGACGTATCGACGGTACGATTATCGCCAGCCGGTGAATAACCTGGCGCTCTGGAAAGCGA
TCCGGCCATTTCGCATCGTGGTCCGTGACCTCAACAAAAATAACGTGCGGTAAATTTCCGGCGGTGGTTCAAGGCACGAACCCGCGCACGTTGGGTTTATCG
GTAAAGGCATGCTAACCGCTGCGGTTCGCGCGACGTTTTTCGCTCCCGGAGCGTGATGCGGTACTGACCGCATCCAGCGGTACCGGTGAGGCGGGCTGT
TTATTGATCGTGAATAATACACCGGTGACCGTCTTAATTTCCGTCTCGCGCGGAGAAAGCCGTCGCCTTGGTTAACCGTTGAAATGCTGATTGTGGCGA
CGACATCTCCCTGCCGTGATAACAAACACCCACCGCGGCATTGCGGGAACATCCTGGTGCATAAAATCGCAGGCTATTTGCCGAACGCGGCTAACCTCGCCA
CCGTCTTGCGTGAAGCGCAGTACCGGSCCAATAACACCTTCAGCCTGGGCGTTCGCGTTTCCAGCTGTCATCTGCCGAAGAAGCCGACGCGCCCCCGTCAT
CATCCGGGCAACGCGAATCTGGCATGGCATTCACGGCGAACCAGGCGCATCGGTTATCGACACCCAGAACAGTGCAGAGTGGTCAACCTGATGGTGATAA
ACTGTGGGAGCCCTGCCTGAAACCGCGCTGCTGGCGGTGATGATTAAATCTTGGCGCGTTTCCTTTCGCGAAATGGCCATCATACCCGCGAATCGCCA
GCAGCCCGCTGCACCGATGATCGACTGGCTGATTGGCCCGGCTCATCTGGTCACCGGCTGATATGAAGGCTTTCCTACTGACGGCCATCGTCTGGAAGAA
AGCATCGAAAAAGGCTTACTACCGGAGGTGGAAACAGCAACTGGCCGACGCCGCTCCGCCGCGTGAAATCACTTCTGTAACCATCATCTCAGCGTAGCGGAAG
CGTGGAATTCCAGCCTTCGGCGAACGCGATGGTGGCCGGGATTGTGGAACTTGTACCGCAACCCCTTCCGATCTGGAGACTCATCTTAATGCGCTGGACGCCA
AAGTCGGCGATGGCGATACCGGTTTCGACCTTTGCCGCTTCGCGCGTGAAATTCGCAGTCTGTGTCATCGCCAGCAGTTCGCCGCTGATAACCTTGCCACGCTG
TTCGCGCTGATTGGCGAACGCTCTGACCGTATGATGGTGGTTCACGCGGTGTGCTGATGTCATATTTCTTTACCGGTGCGGGCAGAACTGGAACAGGGAAGC
TAGCGTTGCGGATCTCTGAATACGGGACTGGCGCAGATGAAGTTCTACGCGCGCGCAGACGAAGGCGATCGCACATGATTGATGCGCTGCAACAGGCCCTGA
GTTTCGCTGCTCAGCAGCGCAAAATCTGCAGGCCGATTTCGACGCCGCGCAAGCGGAGCCGAACGAACCTGTTTGTGAGCAAAGCCAATGCGGGTCGCGCA
TCGTATCTCAGCAGCGAAAGCTGCTCGGAAATATGGACCCCGCGCGCAAGCGCTAGCGATGGTGTAAAGCGCTAGCGGAGAGTGAGCTGGGCTAA

```

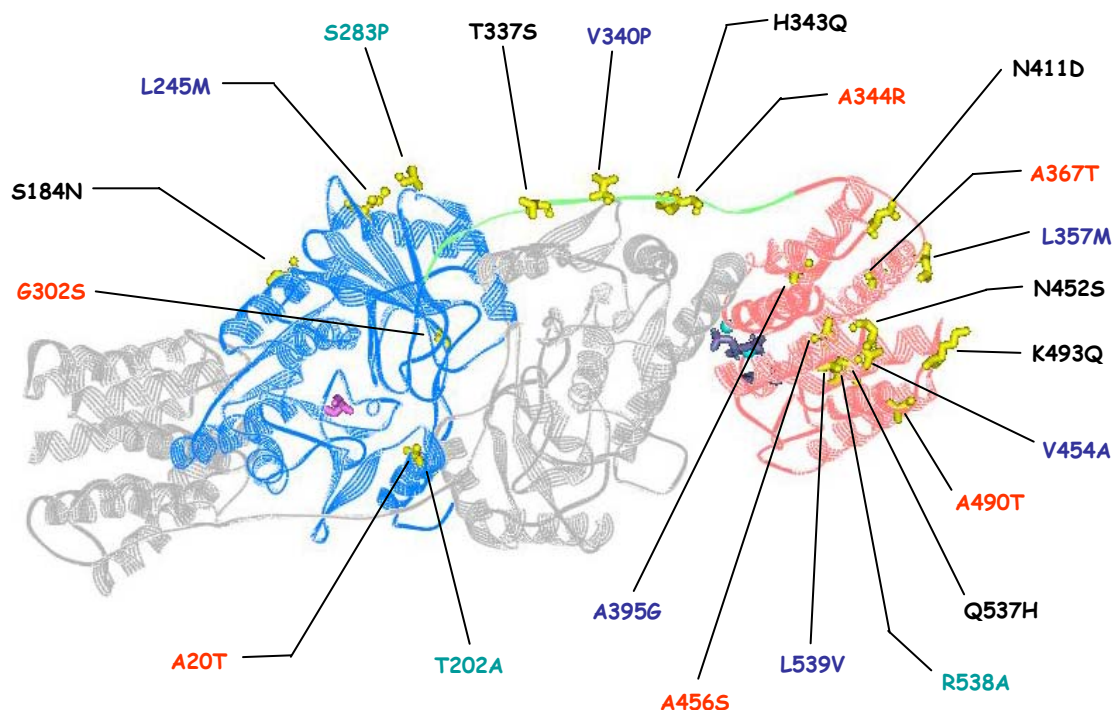
**Figura 2R.** Secuencia del gen *dhak* de *C. freundii* CECT 4626. Los nucleótidos variantes con respecto al gen de la cepa DMS 30040 se subrayan en negro, mostrándose el nucleótido sustituido en la parte superior de cada posición.

La secuencia de esta nueva variante del gen *dhak*, presente en la cepa



CECT 4626 de *C. freundii* fue depositada en el *GeneBank* bajo el número de acceso DQ473522.

De las 117 variaciones a nivel de ADN, solo 26 producen alteraciones en la secuencia aminoacídica con respecto a la proteína de la cepa DMS 30040 (*Swiss-Prot*: P45510), siendo las 91 restantes mutaciones silenciosas (77,8 %). Cuatro de esas 26 variaciones de nucleótidos coinciden con otras en un mismo codón de la secuencia genética, por lo que la proteína variante de la cepa CECT 4626 difiere en 22 aminoácidos (4 %) con la de la cepa DMS 30040 (Figura 3R).



**Figura 3R.** Estructura de rayos-x del dímero de DHAK de *C. freundii* DMS 30050 (*Protein Data Bank*: 1UN9). Una de las subunidades se muestra coloreada y la otra en gris. El dominio-K se muestra en color azul y el dominio-L en rojo. Se representan en modelo *ball and sticks* la DHA (morado) y ATP (azul oscuro). Se muestran en amarillo la posición de los aminoácidos cambiados en la cepa CECT 4626. El texto señala la mutación correspondiente y su color la alteración de polaridad con el cambio de aminoácido: polar por polar (negro), apolar por apolar (azul), polar por apolar (verde) y apolar por polar (rojo).

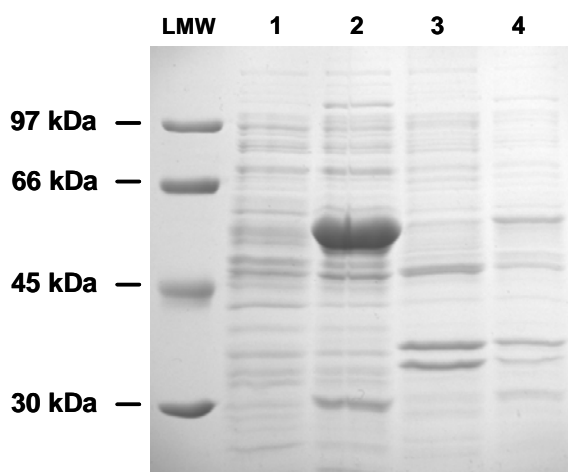
En cuanto a la distribución de los aminoácidos cambiados, 12 se sitúan en el dominio-L de unión a ATP (L357M, A367T, A395G, N411D, N452S, V454A, A456S, A490T, K493Q, Q537H, R538A y L539V), justo el doble que los 6

modificados en el dominio-K de unión a DHA (A20T, S184N, T202A, L245M, S283P y G302S); las 4 sustituciones restantes se acumulan en la región conectora de los dos dominios (T337S, V340P, H343Q y A344R) (Figura 3R).

Con todos los datos aportados podemos concluir que se identificó una nueva variante de DHAK presente en la cepa CECT 4626 de *C. freundii*, con un 96 % de homología en secuencia aminoacídica con respecto a la variante hasta ahora descrita de la cepa DMS 30040 del mismo microorganismo. Los genes que codifican para las dos variantes de DHAK presentan una identidad en su secuencia nucleotídica del 92,9 %.

### Sobre-expresión, purificación y análisis de la DHAK

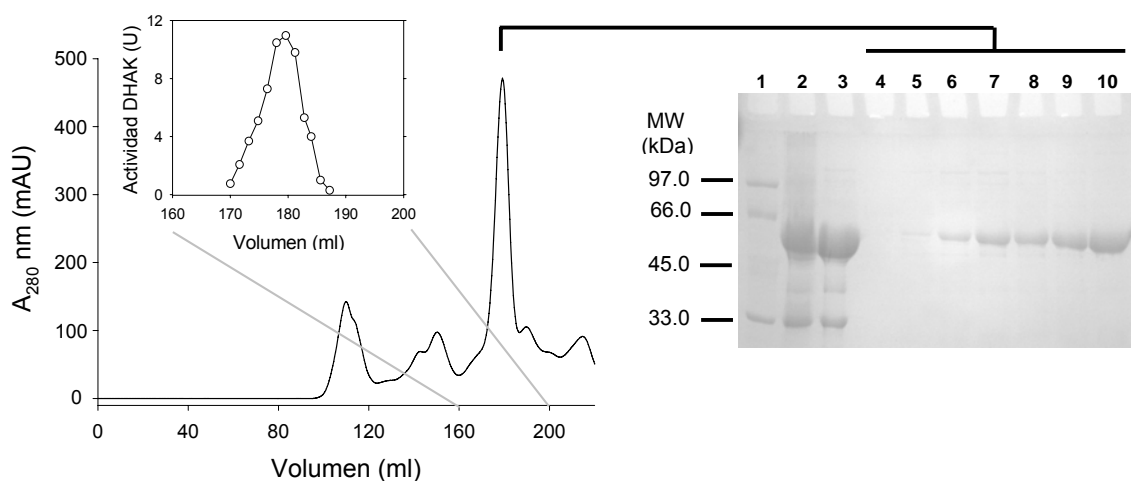
En paralelo a la secuenciación del gen, la construcción pRSET-*dhak* se transformó en células de *E. coli* BL21(DE3) para su expresión. Ésta se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Los resultados mostraron que la proteína no solo se sobre-expresa a un gran nivel, 56% con respecto al total de proteína en el extracto, sino que además aparece en la fracción soluble y apenas un 8% del total de la DHAK expresada aglutina para dar cuerpos de inclusión (Figura 4R).



**Figura 4R.** Análisis de la expresión de DHAK recombinante mediante SDS-PAGE. **LMW:** marcadores de peso molecular; **1:** fracción soluble antes de la inducción; **2:** fracción soluble después de la inducción; **3:** fracción insoluble antes de inducción; **4:** fracción insoluble después de la inducción. El monómero de DHAK recombinante tiene un peso molecular de 63 kDa.

El nivel de sobre-expresión también se evaluó mediante ensayo de la actividad DHAK en la fracción soluble del lisado celular (CFE). La producción de este sistema de expresión fue de 3.195 U/L<sub>cultivo</sub> frente a 0,185 U/L<sub>cultivo</sub> obtenidos con un control de BL21(DE3) no transformada, lo cual supone un incremento de unas 26.600 veces con respecto a la actividad DHAK intrínseca que posee esta cepa de *E.coli* (Gutknecht *et al.*, 2001).

La purificación de la DHAK recombinante, la cual contiene una cola de 6 histidinas en su extremo N-terminal, se realizó mediante cromatografía de afinidad a cationes metálicos divalentes (IMAC), seguida de un paso de exclusión molecular. Para la purificación por IMAC se utilizó una resina de agarosa con una alta densidad de Ni<sup>2+</sup> (20-35 µmoles Ni<sup>2+</sup>/ml resina) inmovilizado con ácido iminodiacético (IDA) como conector (Figura 5R). El resultado de los diferentes pasos de purificación se resume en la Tabla 1R.



**Figura 5R.** Cromatograma de la purificación de la DHAK recombinante mediante cromatografía de exclusión molecular. Los insertos muestran el perfil de actividad DHAK durante la purificación y su análisis mediante SDS-PAGE: 1, marcadores de peso molecular; 2, CFE; 3, DHAK después de purificación por IMAC; 4-10, fracciones que contienen actividad DHAK.

El paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular es imprescindible para eliminar completamente la presencia de la enzima triosafosfato isomerasa (TIM), presente en el la fracción soluble del lisado celular. Como se verá más adelante, la aplicación sintética de la DHAK conjuntamente con las aldolasas dependientes de DHAP es especialmente

sensible a la contaminación por TIM, incluso en pequeñas cantidades, por lo que es de vital importancia su completa eliminación durante la purificación. Después de los dos pasos de purificación se obtuvo la proteína con un grado de pureza superior al 98%, estimada mediante densitometría en SDS-PAGE. La actividad específica de la DHAK purificada es de 10,7 U/mg.

**Tabla 1R.** Resumen de la purificación de DHAK recombinante. Se muestran los resultados de una purificación típica, partiendo de 4,5 ml de fracción soluble (200 ml de cultivo celular).

Muestra	Actividad (U)	Proteína (mg/ml)	Volumen (ml)	Act. específica (U/mg)	Grado de purificación	Recuperación (%)
Fracción soluble	479,2	23,98	4,5	4,44	—	100
Ni <sup>2+</sup> -Agarosa cromatografía	219,0	6,2	5	7,06	1,6	45,7
Superdex 75 HiLoad cromatografía	182,5	0,85	20	10,7	2,4	38,1

Como herramienta de identificación de la proteína, se realizó un análisis de la huella peptídica a partir de la banda correspondiente al monómero de DHAK, obtenida mediante SDS-PAGE. Este análisis permitió la identificación de 29 péptidos que cubren la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de la DHAK de *C. freundii* (Figura 6R).

1073.5524 900.4873 2674.4127  
 MSQFFFNQRTHLVSDVIDGTIIASPWNNLARLES DPAIRIVVRDLNKNNAVVISGGGSGHEPAHVGFIGKGM  
 2392.2915 1668.8420 2361.2643  
 TAAVCGDVFAFSPSVDVLTAIQAVTGEAGCLLIVKNYTGDRNLNFGLAEEKARRLGYNVEMLVGDDISLPDNKH  
 1916.0885 1006.5968 2595.3246  
 PRGIAGTILVHKIAGYFAERGINLATVLRQAQYAAANTFSLGVALSSCHLPQEAADAAPRHHPGHAELGMGIHGE  
 926.5010 1058.5799 3188.4150 1106.6375  
 PGASVIDTQNSAQVVLNLMVDKLMALPETGRLAVMINNLCGVSAEMAIITRELASSPLHPRIDWLIGPASLVT  
 2007.0609 2172.2123 1843.0349  
 ALDMKSFSLTAIVLEESIEKALLTEVETSNWPTVPVPREISCVSSQRSARVEFQPSANAMVAGIVELVTITLS  
 1381.6885 2012.1120  
 DLETHNALDAKVGDTGSTFAAGAREIASLLHROQLPLDNLATLFA LIGERLTVVMGGSSGVLM SIFFTAAG  
 1947.0142 938.5635 3454.5743  
 QKLEQGASVAVESLNTGLAQMKFYGGADEGDRMTIDALQPALTSLLTQPCNLQA AFDAQA GAERTCLSSKANAG  
 1086.5210  
 RASYLSSESLLGNMDPGAHAVAMVFKALAESELG

**Figura 6R.** Secuencia de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Los péptidos identificados mediante huella peptídica están sombreados y subrayados cuando solapan. Los aminoácidos de la DHAK variante se señalan en negro.

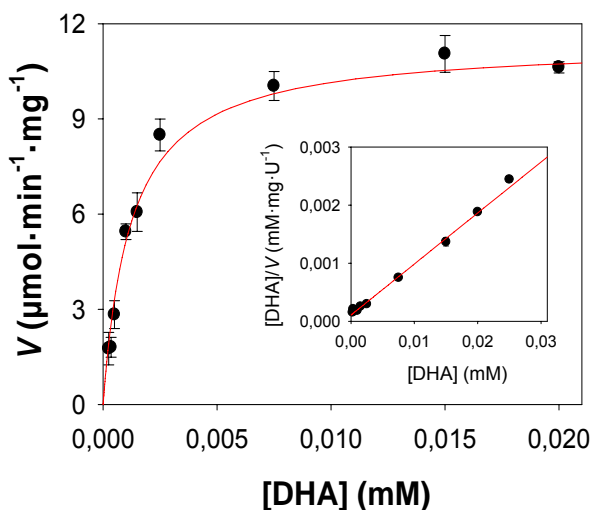
La huella peptídica obtenida confirma además que la proteína expresada y purificada es la DHAK presente en la cepa CECT 4626 de *C. freundii*, ya que 9 de los péptidos identificados contienen la secuencia esperada para esta proteína variante (Figura 6R).

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA DHAK DE *C. freundii* CECT 4626

### Caracterización cinética

#### Constantes cinéticas con respecto a la DHA

Las constantes cinéticas para la DHAK recombinante de *C. freundii* CECT 4626 se resumen en la Tabla 2R. La DHAK muestra una típica cinética de Michaelis-Menten con respecto a la DHA (Figura 7R).



**Figura 7R.** Ensayo cinético con respecto al sustrato DHA de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. La actividad quinasa se valoró por cuadruplicado a distintas concentraciones de DHA, empleando una concentración constante de Mg-ATP de 5 mM. El inserto muestra la representación de Hanes-Woolf utilizada para la determinación de las constantes cinéticas.

El valor de  $K_M$  aparente calculado (con una concentración fija de Mg-ATP de 5 mM) fue  $0,0012 \pm 0,0003$  mM, con una  $k_{\text{cat}}$  aparente de  $24,13 \pm 0,92$  s<sup>-1</sup>. Por lo

tanto, la  $k_{cat}/K_M$  aparente de la enzima es  $1,98 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , que es el valor más alto de eficiencia catalítica descrito hasta la fecha para una DHAK.

El cálculo de una  $K_M$  tan pequeña no fue fácil pues, al trabajar a concentraciones tan bajas de sustrato, las diferencias de absorbancia por consumo de NADH en la valoración de actividad eran mínimas, con el consiguiente error de valoración al exceder el límite de sensibilidad del ensayo. Para solventar este problema se diseñó un nuevo ensayo de actividad empleando muy bajas concentraciones de DHAK (0,08  $\mu\text{g/ml}$ ) y tiempos de valoración más largos. De esta forma, se obtuvieron  $\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min}$  distinguibles incluso ante pequeñísimas variaciones de la concentración de DHA.

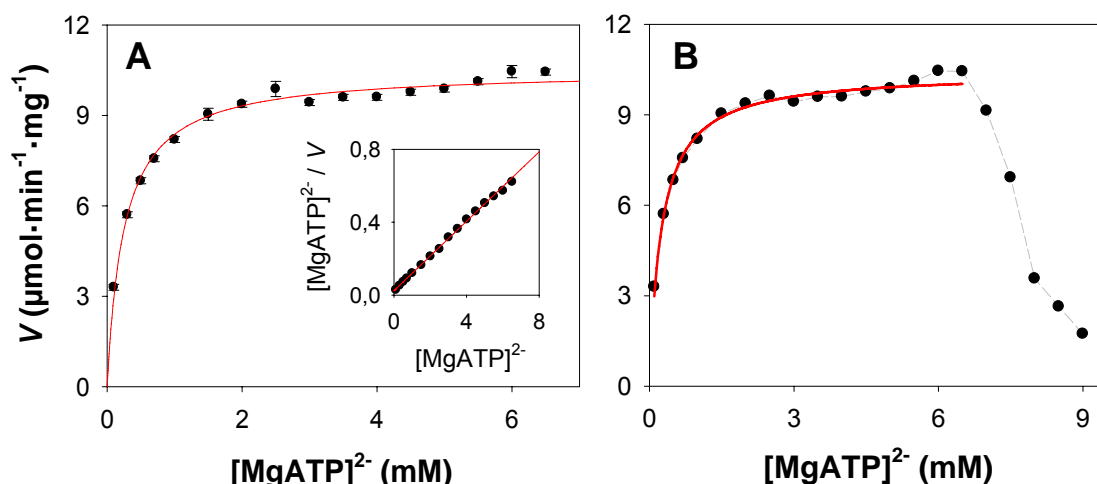
**Tabla 2R.** Resumen de las constantes cinéticas calculadas para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, para diferentes sustratos e inhibidores.

Sustratos	$K_M^{app}$ (mM)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}^{app}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}^{app} / K_M^{app}$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_{cat} / K_M$ ( $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$K_i$ (mM)
DHA	0,0012	0,0015	24,13	29,1	$1,98 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$	
[MgATP] <sup>2-</sup>	0,35	0,15	24,02	29,1	$6,9 \times 10^4$	$1,94 \times 10^5$	
ADP							0,12
D,L-GA	0,15		2,39		$1,6 \times 10^4$		$K_{ic} = 48,1$ $K_{iu} = 42,1$
D-GA	0,13		3,18		$2,4 \times 10^4$		

### Constantes cinéticas con respecto al Mg-ATP

En lo que respecta al donador de fosfato de la DHAK, el auténtico sustrato en este tipo de quinasas no es el ATP libre, sino el complejo que forma al unirse a un catión divalente, generalmente el  $\text{Mg}^{2+}$  por su disponibilidad intracelular (Morrison, 1979). La única especie de Mg-ATP relevante en disolución cuando el pH es 7 o superior es  $[\text{MgATP}]^{2-}$ , por lo que podemos identificar a este complejo como el sustrato de la enzima (Morrison, 1979). La DHAK de *C. freundii* CECT 4626 presenta una típica cinética hiperbólica de saturación para concentraciones del complejo  $[\text{MgATP}]^{2-}$  entre 0,1 mM y 7,0 mM (Figura 8R-A).

El valor de  $K_M$  calculado en este intervalo es  $0,35 \pm 0,01$  mM, que es muy similar al previamente descrito para la DHAK de la cepa DMS 30040 (García-Alles *et al.*, 2004). Los valores calculados de  $k_{cat}$  y  $k_{cat}/K_M$  aparentes son  $24,02 \pm 0,37$  s<sup>-1</sup> y  $6,9 \times 10^4$  s<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 2R).

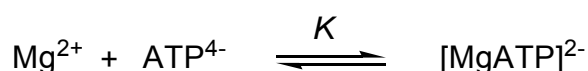


**Figura 8R.** Actividad de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en función de la concentración de  $[MgATP]^{2-}$ . **A:** los datos de actividad DHAK obtenidos a concentraciones de entre 0,1 mM y 7,0 mM se ajustan a una cinética hiperbólica. El inserto muestra la representación de Hanes-Woolf utilizada para la determinación de las constantes cinéticas. **B:** se observa una pronunciada inhibición por exceso de sustrato a concentraciones de  $[MgATP]^{2-}$  superiores a 7 mM.

Si bien la DHAK muestra una típica cinética de saturación para valores del sustrato  $[MgATP]^{2-}$  inferiores a 7 mM, cuando se supera esta concentración se produce un significativo descenso de la actividad enzimática (Figura 8R-B). No obstante, el patrón de inhibición obtenido con exceso de  $[MgATP]^{2-}$  no responde a una típica inhibición por exceso de sustrato. La inhibición por exceso de sustrato se debe a que dos moléculas del sustrato se aproximan simultáneamente al mismo sitio catalítico; para que este fenómeno se produzca, la segunda molécula de sustrato debe aproximarse al sitio de unión muy rápidamente una vez que se ha unido la primera molécula, de lo contrario la primera se coloca correctamente y tiene lugar la catálisis. Este proceso es totalmente aleatorio y depende de la cantidad de colisiones producidas entre moléculas, por lo que se manifiesta mas evidentemente cuanto mayor es la cantidad de sustrato (Cornish-Bowden, 2004).

Los datos experimentales obtenidos no correlacionan con el modelo teórico aceptado, basado en una modificación de la ecuación de Michaelis-Menten, donde se introduce la constante  $k_{IS}$  debida a la inhibición por exceso de sustrato (Cornish-Bowden, 2004). El descenso de actividad producido en una típica inhibición por exceso de sustrato es lento y se prolonga hasta altas concentraciones, mientras que la DHAK pierde prácticamente toda su actividad cuando la concentración de  $[MgATP]^{2-}$  llega a 9 mM (Figura 9R-A). Considerando únicamente los datos de inhibición a concentraciones de  $[MgATP]^{2-}$  entre 7 mM y 9 mM se puede calcular el valor de  $IC_{50}$  producida por exceso de sustrato, que se determinó en 7,8 mM.

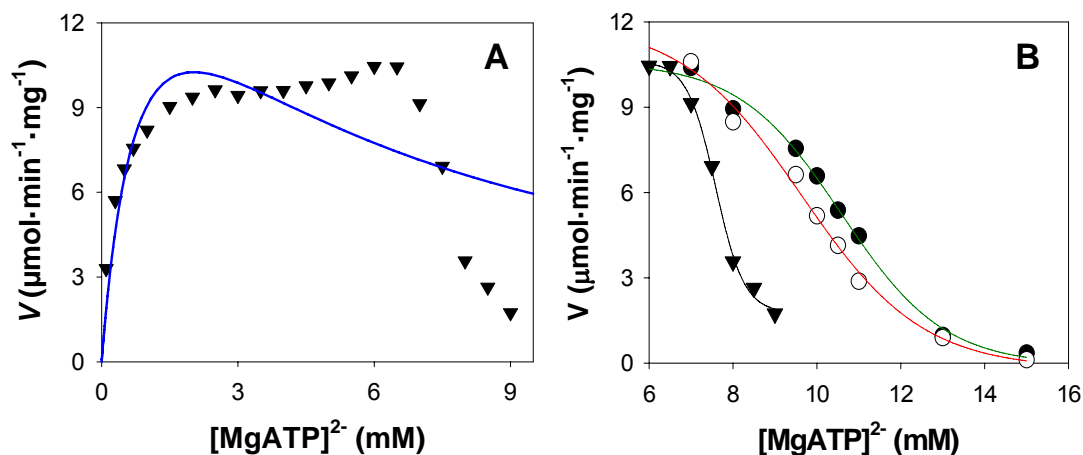
Con el fin de comprender mejor la naturaleza de la inhibición por exceso de sustrato se realizaron nuevos ensayos cinéticos, valorando la actividad DHAK a concentraciones de  $[MgATP]^{2-}$  superiores a 7 mM, pero variando los excesos constantes de  $Mg^{2+}$  utilizados en el ensayo (Figura 9R-B). La formación de  $[MgATP]^{2-}$  a partir de  $ATP^{4-}$  y  $Mg^{2+}$  tiene lugar mediante un equilibrio, gobernado por la constante de estabilidad del complejo ( $K$ ). Esta constante  $K$  fue calculada para las condiciones fisicoquímicas del medio de reacción, obteniéndose un valor de  $5,48 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (ver Materiales y Métodos).



Cuanto mayor es el exceso de  $Mg^{2+}$  utilizado en el ensayo con respecto al ATP total, más desplazado está el equilibrio hacia la formación del complejo, y mayor es la concentración en disolución de  $[MgATP]^{2-}$ . En los ensayos cinéticos convencionales, como el empleado para determinar las constantes cinéticas del  $[MgATP]^{2-}$  (Figura 8R) se utilizaron excesos altos de  $Mg^{2+}$  (40 mM con respecto al ATP), para desplazar completamente el equilibrio hacia la formación del sustrato. Sin embargo, cuando se utilizaron excesos más bajos de  $Mg^{2+}$  con respecto al ATP (0,5 mM y 2 mM) se pudieron observar ligeras diferencias en el patrón de inhibición obtenido inicialmente, que pueden atribuirse a una menor concentración final de complejo (Figura 9R-B). Ensayos realizados con excesos de  $Mg^{2+}$  superiores a 2 mM no mostraron variaciones significativas con respecto al patrón de inhibición inicialmente obtenido, pues dichos excesos de catión



parecen ser suficientes para producir un casi completo desplazamiento del equilibrio hacia la formación de  $[\text{MgATP}]^{2-}$ .



**Figura 9R.** Actividad de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en función de la concentración de  $[\text{MgATP}]^{2-}$ . **A:** ajuste de los datos de actividad DHAK al modelo cinético de inhibición por exceso de sustrato, cuya ecuación se muestra en Materiales y Métodos (Ecuación 2). **B:** ensayos realizados con excesos constantes de  $\text{Mg}^{2+}$  de 0,5 mM (●), 2,0 mM (○) y 40 mM (▼).

Las concentraciones calculadas de  $[\text{MgATP}]^{2-}$  para excesos de  $\text{Mg}^{2+}$  de 0,5 y 2,0 mM fueron, entre 0,1 mM y 0,2 mM menores que las calculadas para los mismos puntos del ensayo realizado con 40 mM de exceso de  $\text{Mg}^{2+}$ . Esta pequeña diferencia en la concentración final de inhibidor se mostró suficiente para modificar el patrón de inhibición por exceso de sustrato. Como se puede observar en la Figura 9R, el descenso de actividad DHAK a bajos excesos de  $\text{Mg}^{2+}$ , aun siendo todavía pronunciado, es ligeramente más suave que a un exceso de 40 mM. Este hecho se manifiesta en un incremento de la  $\text{IC}_{50}$  producida por exceso de sustrato desde 7,8 mM (con excesos de 40 mM) hasta valores en torno a 10 mM.

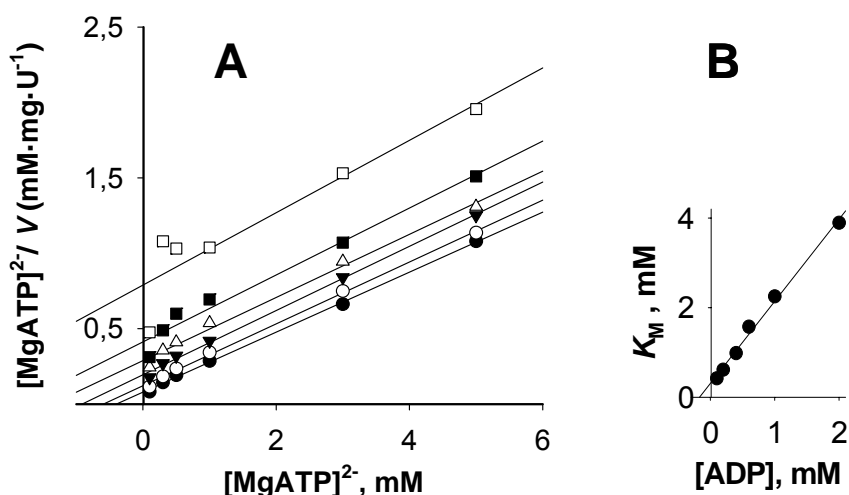
A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que la inhibición por exceso de  $[\text{MgATP}]^{2-}$  no corresponde a una típica inhibición por exceso de sustrato, puesto que el patrón cinético de inhibición no se ajusta al modelo matemático existente para tal supuesto. Tanto el patrón cinético de inhibición como los posteriores estudios realizados con diferentes excesos de  $\text{Mg}^{2+}$  apuntan a la posibilidad de una inhibición alostérica por exceso del sustrato  $[\text{MgATP}]^{2-}$ , tal y como sucede con otros enzimas metabólicos como las

fosfofructoquinasas (PFKs) de la glicolisis, las cuales presentan comportamientos cinéticos muy similares al descrito para la variante de DHAK.

### Inhibición por ADP y gliceraldehído

Tanto ADP como gliceraldehído (GA) han sido descritos en la bibliografía como inhibidores de diferentes DHAKs (Erni *et al.*, 2006).

Durante la caracterización cinética de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se encontró que el ADP es un potente inhibidor de la actividad quinasa. Los estudios cinéticos realizados con respecto al  $[\text{MgATP}]^{2-}$  como sustrato variable, en presencia de concentraciones crecientes de ADP, muestran un claro patrón de inhibición competitiva (Figura 10).

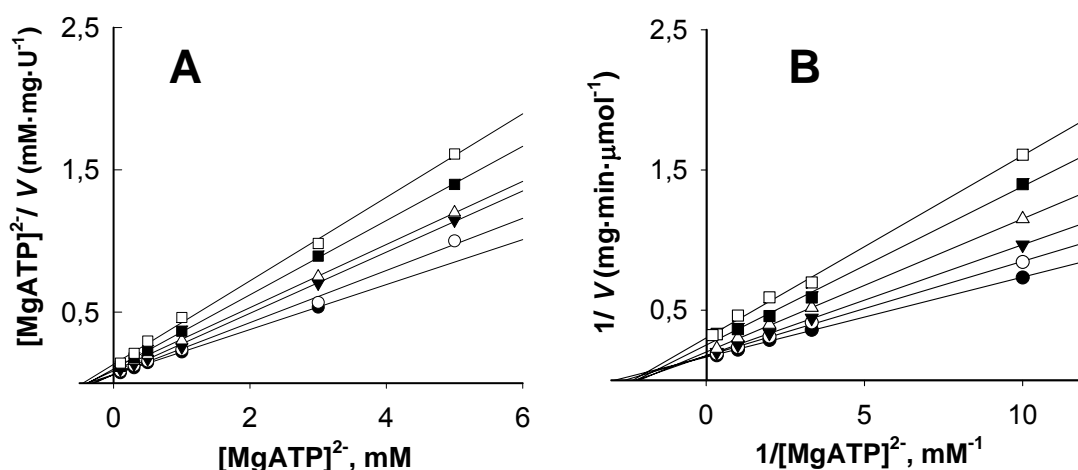


**Figura 10R.** Inhibición por ADP. **A:** representación de Hanes-Woolf a partir de los datos de actividad DHAK a diferentes concentraciones de  $[\text{MgATP}]^{2-}$  en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor ADP: 0,1 mM (●), 0,2 mM (○), 0,4 mM (▼), 0,6 mM (Δ), 1,0 mM (■) y 2,0 mM (□). **B:** representación de los datos de  $K_M$  obtenidos frente a la concentración de ADP.

La representación de Hanes-Woolf a partir de los datos cinéticos obtenidos muestra un patrón de líneas paralelas, típico de un inhibidor competitivo (Cornish-Bowden, 2004) (Figura 10R-A). La constante de inhibición aparente para el ADP se calculó representando los valores de  $K_M$  obtenidos frente a la concentración del inhibidor a la cual se realizaron cada uno de los ensayos cinéticos (Figura 10R-B). El valor de  $k_i$  para el ADP calculado para la nueva

variante de DHAK fue 0,12 mM (Tabla 2R), que es del mismo orden que las constantes de inhibición previamente descritas para las DHAKs de *C. freundii* DMS 30040 (0,14 mM, García-Alles *et al.*, 2004), *S. pombe* IFO 0354 (0,20 mM, Itoh *et al.*, 1999) y *A. xylinum* (0,40 mM, Weinhouse y Benziman, 1976).

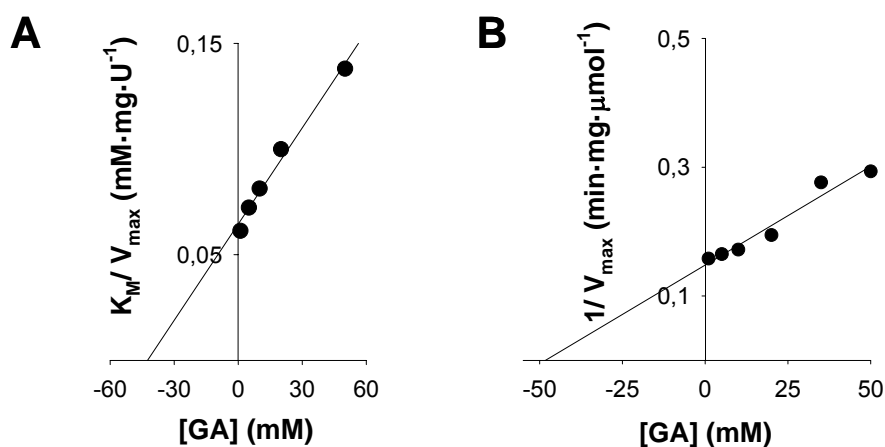
Por otro lado, también se realizaron estudios cinéticos de inhibición del GA con respecto al sustrato  $[\text{MgATP}]^{2-}$ . La representación de Hanes-Woolf de los datos obtenidos a concentraciones crecientes de GA, indica claramente la existencia de una inhibición mixta, que parece contar con un mayor componente acompetitivo ( $k_{iu} < k_{ic}$ ) (Figura 11R-A). Se aprecian un conjunto de líneas, cuya pendiente disminuye a medida que aumenta la concentración de inhibidor, que cortan en diferentes puntos del eje-X en el primer cuadrante.



**Figura 11R.** Inhibición por GA. Representación de Hanes-Woolf (A) y doble recíproca (B) a partir de los datos de actividad DHAK a diferentes concentraciones de  $[\text{MgATP}]^{2-}$  en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor GA: 1 mM (●), 5 mM (○), 10 mM (▼), 20 mM (Δ), 35 mM (■) y 50 mM (□).

El patrón de líneas obtenido en la representación doble recíproca de los datos cinéticos también concuerda con una inhibición mixta con mayor componente acompetitivo (Figura 11R-B). No obstante, dada la gran proximidad entre los puntos de corte en el eje-X no se puede descartar completamente la posibilidad de una inhibición mixta pura o no-competitiva ( $k_{iu} = k_{ic}$ ) hasta no calcular las constantes de inhibición (Cornish-Bowden, 2004).

Al ser el GA un inhibidor mixto se calcularon tanto la constante de inhibición competitiva ( $k_{ic}$ ) como la acompetitiva ( $k_{iu}$ ), representando los valores de  $1/V_{max}$  y  $K_M/V_{max}$ , obtenidos en los ensayos cinéticos, frente a la concentración de inhibidor empleada en cada uno de ellos (Figura 12R). La  $k_{ic}$  calculada fue de 48,1 mM mientras que la  $k_{iu}$  tiene un valor de 42,1 mM (Tabla 3), confirmándose que se trata de una inhibición mixta con un mayor componente acompetitivo ( $k_{iu} < k_{ic}$ ).

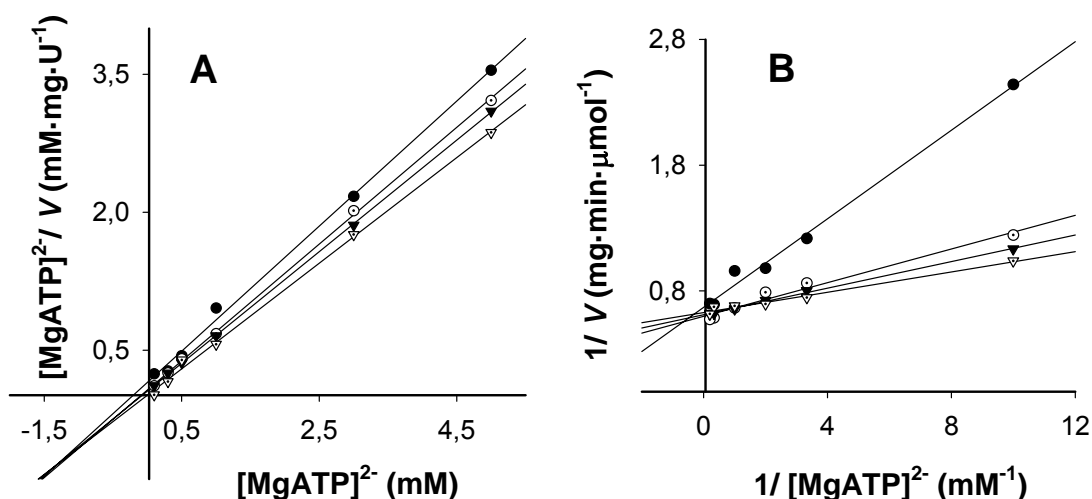


**Figura 12R.** Representaciones secundarias de los parámetros cinéticos, obtenidas a partir de ensayos realizados en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor, utilizados para calcular  $k_{iu}$  (A) y  $k_{ic}$  (B). Las constantes de inhibición vienen dadas por el valor absoluto de la intersección de cada regresión lineal con el eje-X.

### Determinación del mecanismo de reacción

Con el fin de determinar el mecanismo de la reacción enzimática catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 y las constantes cinéticas reales, se realizaron ensayos cinéticos bi-sustrato, modificando las concentraciones tanto de DHA como de  $[MgATP]^{2-}$ . Los datos directos obtenidos en el ensayo fueron analizados mediante la representación secundaria de Hanes-Woolf (Figura 13R-A) y doble recíproca (Figura 13R-B). Tanto las pendientes como los puntos de intersecciones con el eje-Y obtenidos de la gráfica de Hanes-Woolf se representaron frente a  $1/[DHA]$ , obteniéndose así los parámetros cinéticos reales  $k_{cat}$ ,  $K_{M,MgATP}$  y  $K_{M,DHA}$ , con valores de  $29,1 \pm 2,3 \text{ s}^{-1}$ ,  $0,15 \pm 0,01 \text{ mM}$  y  $0,0015 \pm 0,0006 \text{ mM}$  respectivamente. La representación de Hanes-Woolf

muestra un patrón de líneas que convergen en un mismo punto situado en el segundo cuadrante (Figura 13R-A). El patrón observado con la representación doble recíproca es similar, pero las líneas convergen ligeramente a la izquierda del eje  $1/V$  (Figura 13R-B). Estos resultados sugieren un mecanismo de reacción en el cual debe intervenir un complejo ternario, y puede ser explicado aplicando la correspondiente modificación de la ecuación de Albery para un mecanismo bi bi secuencial, ya sea ordenado o al azar (ver Materiales y Métodos). Por otro lado, hemos observado que el ADP es un inhibidor competitivo con respecto al  $[\text{MgATP}]^{2-}$  a concentraciones saturantes de DHA, unas 290 veces por encima de su  $K_M$  aparente, lo cual es coherente con un mecanismo bi bi secuencial al azar (Cornish-Bowden, 2004).



**Figura 13R.** Cinéticas bi-sustrato de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, empleando como sustrato variable el  $[\text{MgATP}]^{2-}$  y cuatro concentraciones fijas de DHA: 7,5  $\mu\text{M}$  (●), 10  $\mu\text{M}$  (○), 15  $\mu\text{M}$  (▼) y 20  $\mu\text{M}$  (Δ). Se utilizaron representaciones de Hanes-Woolf (A) y doble recíproca (B).

Este resultado coincide con el mecanismo bi bi secuencial al azar previamente propuesto para la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 (García-Alles *et al.*, 2004), basado en su estructura cristalográfica y en estudios cinéticos realizados con ATP y GA como sustratos.

Por otro lado, la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 muestra una acusada inhibición por exceso de  $[\text{MgATP}]^{2-}$ , pero la inhibición por exceso de sustrato es incompatible con un mecanismo bi bi secuencial al azar (Cornish-Bowden,

2004). No obstante, la inhibición observada en esta variante de DHAK no es una típica inhibición por exceso de sustrato, sino que se asemeja más a una inhibición alostérica, compatible con el mecanismo propuesto (ver Discusión).

Por lo tanto, dada la gran similitud entre las dos variantes de DHAK de las cepas CECT 4626 y DMS 30040, que poseen una identidad en su secuencia aminoacídica del 96 % y la coincidencia en patrones de inhibición, cinéticas mono-sustrato y cinéticas bi-sustrato, podemos concluir que ambas tienen un mecanismo bi bi secuencial al azar, con posible inhibición alostérica por MgATP.

### Estudios de actividad con distintos cationes divalentes

Cualquier enzima que catalice reacciones dependientes de nucleótidos trifosfato (NTP) requiere de la participación de cationes divalentes ( $\text{Me}^{2+}$ ) pues el NTP libre no es el sustrato sino el complejo Me-NTP que forma con el catión (Engelhardt *et al.*, 2004). Las DHAKs ATP-dependientes no son una excepción pues la presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  es imprescindible para su actividad enzimática. La estructura cristalográfica de la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 revela que se requieren dos cationes  $\text{Mg}^{2+}$  para mediar la interacción del ATP a su sitio catalítico, pues forman una esfera de coordinación entre los tres fosfatos del ATP y los residuos de tres aspárticos situados en el centro activo: Asp-380, Asp-385 y Asp-387 (Siebold *et al.*, 2003a). No obstante, aunque *in vivo* sea el  $\text{Mg}^{2+}$ , por su biodisponibilidad en el interior celular, el que medie en la interacción del ATP con el enzima, numerosos experimentos *in vitro* han demostrado que otros  $\text{Me}^{2+}$  diferentes pueden sustituir al  $\text{Mg}^{2+}$  con efectos diversos en la actividad DHAK. Por ejemplo, la DHAK de *K. pneumoniae* puede emplear  $\text{Ca}^{2+}$  en lugar de  $\text{Mg}^{2+}$ , con un incremento de actividad del 50 % (Jonson *et al.*, 1984). La isoforma I de *S. ponbe* IFO 0354 también puede emplear  $\text{Ca}^{2+}$ , pero no se observa incremento en su actividad sino un ligero descenso del 2%, y mantiene la mitad de su actividad cuando utiliza  $\text{Co}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  (Yoshihara *et al.*, 1996).

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene sobre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 la utilización de otros cationes divalentes diferentes al  $\text{Mg}^{2+}$ , se valoró la actividad DHAK con  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . Se emplearon

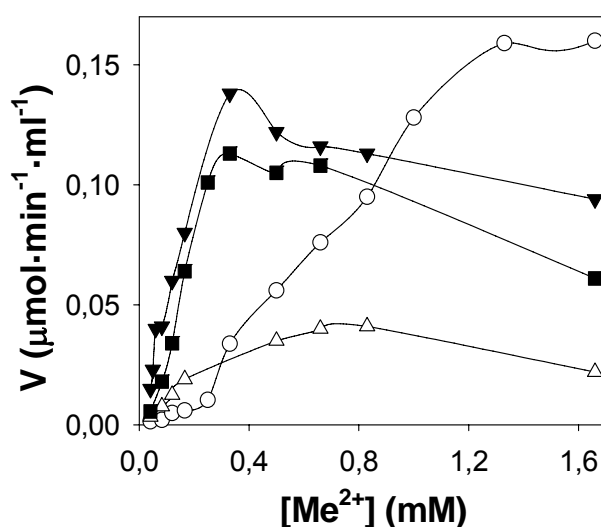
dos concentraciones distintas de cada catión: una limitante (0,83 mM) y otra en exceso (5,8 mM) con respecto al ATP total usado en el ensayo (Tabla 3R).

**Tabla 3R.** Actividades DHAK relativas obtenidas con dos concentraciones diferentes de  $\text{Me}^{2+}$ .

	Actividad relativa (%)						
	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
$[\text{Me}^{2+}] = 5,8 \text{ mM}$	100	138	114	0	0	51	91
$[\text{Me}^{2+}] = 0,83 \text{ mM}$	100	98	94	0	0	18	44

Los datos de actividad para cada catión indican que la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 no puede emplear  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Ni}^{2+}$  en sustitución del  $\text{Mg}^{2+}$ . El resto de los cationes si son sustrato de la enzima pero su actividad varía considerablemente en función de la concentración.

A la vista de la gran importancia que tiene la concentración de catión utilizada, se realizaron nuevos ensayos de actividad a concentraciones crecientes de los cationes que mostraron alguna actividad en el experimento de actividad relativa, es decir:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . El perfil de actividad obtenido muestra que, cuando se alcanzan determinadas concentraciones de  $\text{Me}^{2+}$  se produce inhibición de la DHAK, manifestada por un descenso en su actividad, con la excepción de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , con los cuales no se ha observado alteración de la actividad a altas concentraciones (Figura 14R).



**Figura 14R.** Evolución de la actividad DHAK en función de la concentración de distintos cationes divalentes ( $\text{Me}^{2+}$ ):  $\text{Ca}^{2+}$  (○),  $\text{Mn}^{2+}$  (▼),  $\text{Co}^{2+}$  (■) and  $\text{Zn}^{2+}$  (Δ).

Este efecto inhibitorio de la actividad por cationes divalentes es conocido en otros enzimas que emplean NTP (Honzatko *et al.*, 1981) pero hasta el momento no se había descrito en DHAKs ATP-dependientes.

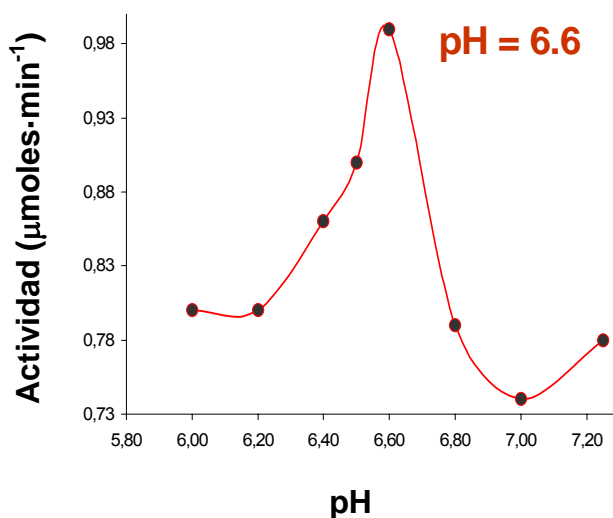
### Estudios de estabilidad y pH óptimo

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas para su utilización y almacenaje se realizó un estudio de estabilidad de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 valorando su actividad a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de temperatura (37 °C, R/T y 4 °C) y en presencia de dimetil-sulfoxido (DMSO), muy empleado como co-disolvente en reacciones enzimáticas para solubilizar reactivos apolares en medio acuoso.

Los resultados indican que la enzima a temperatura ambiente mantiene aproximadamente el 90% de su actividad inicial transcurridas 24 h, un dato muy interesante para su aplicación en síntesis. La presencia de DMSO no afecta drásticamente a su actividad a lo largo del tiempo. A una concentración final del 20% (v/v) mantiene el 90% de su actividad inicial transcurridas 8 h. La estabilidad de la proteína a 4 °C es muy buena (transcurridas 250 h mantiene casi el 70% de su actividad inicial) aunque para su almacenaje se determinó mucho más útil una temperatura de -20°C. Se puede añadir un 20% de glicerol para evitar su congelación a -20°C sin que se observe pérdida de actividad, lo cual facilita la manipulación del producto almacenado. La liofilización, previa diálisis en agua (con el pH ajustado a 7,3) se reveló como el mejor sistema de almacenamiento, manteniéndose actividades de 10 U/mg de liofilizado, sin que se haya observado pérdida de actividad a lo largo del tiempo.

El pH óptimo se calculó mediante valoración de la DHAP producida en reacciones de fosforilación de DHA con DHAK, variando el pH del medio de reacción (Figura 15R). El pH óptimo calculado para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es 6,6, similar al descrito para otras DHAK como la de *Gluconobacter suboxidans* (Tachiki *et al.*, 1987), *S. pombe* 972<sup>-</sup> (Marshall *et al.*, 1986), *Hansenula polymorpha* (Kato *et al.*, 1988) o *Dunaliella parva* (Lemer y Avron, 1977), todas ellas con un pH óptimo de 6,5.





**Figura 15R.** Perfil de actividad de la DHAK CECT 4626 a diferentes valores de pH.

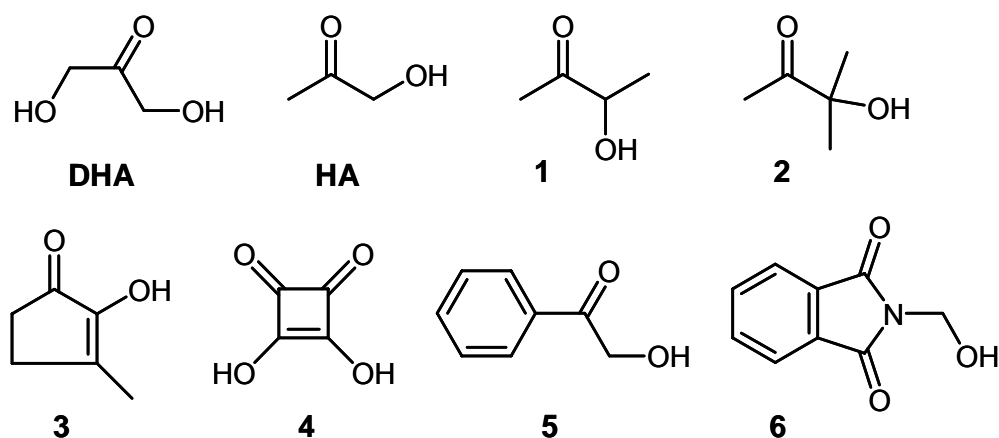
### Estudios sobre la especificidad de sustrato

La especificidad hacia el sustrato donador de fosfato se realizó mediante valoración de la actividad DHAK en presencia de cinco posibles donadores de fosfato: los nucleótidos trifosfato GTP, CTP, TTP y UTP, el poli-fosfato inorgánico (poli-P<sub>i</sub>) y el trifosfato inorgánico, puesto que todos ellos contienen enlaces fosfo-éster de alta energía. En ninguno de los casos se observó actividad, demostrando que la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es muy específica hacia el sustrato donador de fosfato.

La especificidad hacia el sustrato aceptor de fosfato también se realizó valorando la actividad DHAK en presencia de diferentes posibles aceptores. Para valorar la actividad quinasa sobre estos sustratos se utilizó un ensayo enzimático acoplado basado en los enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH), que permite valorar espectrofotométricamente el ADP formado en la fosforilación de un sustrato aceptor. Su valoración a lo largo del tiempo nos proporciona la actividad DHAK. Se analizaron tres tipos de posibles aceptores de fosfato: hidroxicetonas, azúcares y gliceraldehído.

**- Hidroxicetonas:** Se analizaron siete cetonas con al menos un hidroxilo libre como aceptores de fosfato, buscando la mayor diversidad estructural (Figura

16R). Ninguna de ellas presentó actividad, a excepción de la hidroxiacetona (HA), que es fosforilada por nuestra DHAK con una actividad relativa del 2,2% con respecto a un ensayo control con DHA. Este bajo nivel de fosforilación fue posteriormente confirmado mediante ensayos de HPLC, que permitieron detectar la desaparición de ATP y formación de ADP a lo largo del tiempo en reacciones de fosforilación de HA (Figura 17R-B).



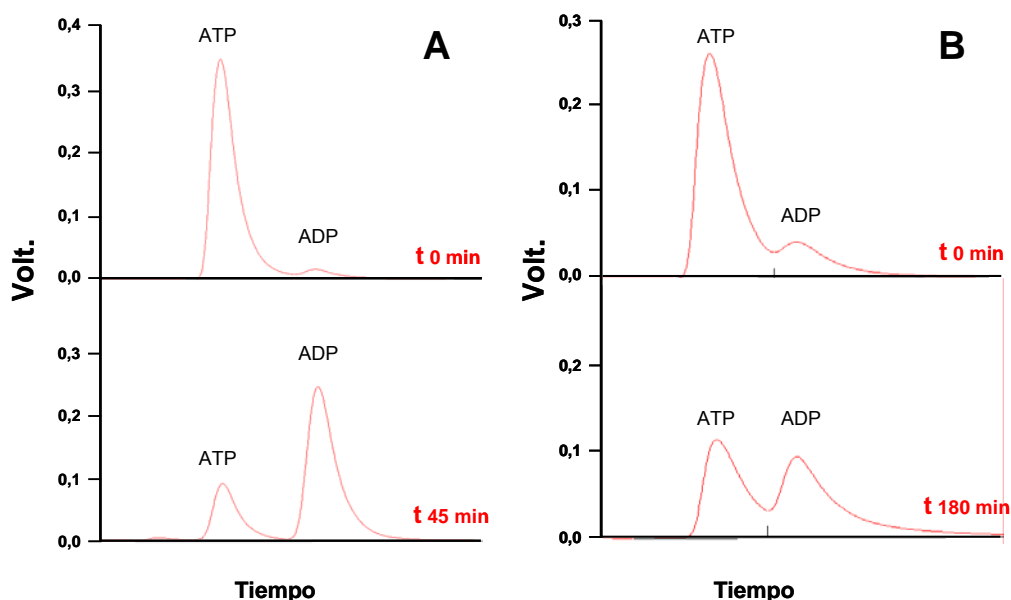
**Figura 16R.** Hidroxiacetonas ensayadas como posibles aceptores de fosfato de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Dihidroxiacetona (**DHA**), hidroxiacetona (**HA**), 3-hidroxi-2-butanona (**1**), 3-hidroxi-3-metil-2-butanona (**2**), 2-hidroxi-1-metil-1-ciclopenten-3-ona (**3**), 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona (**4**), 2-hidroxiacetofenona (**5**) y N-(hidroximetil)-phtalamida (**6**).

- **Azúcares:** se ensayaron varios mono y disacáridos a concentraciones finales de 5 mM: D-xilulosa, D(+)-manosa, D(+)-arabinosa, L(-)-fucosa, L(+)-rhamnosa, D(+)-ribosa, diacetona- D-glucosa, D-fructosa, D(+)-galactosa, D-glucosa y sacarosa. Ninguna de ellas mostró actividad como donador de fosfato.

- **Gliceraldehído (GA):** Es bien conocido que las DHAKs, a pesar de su gran especificidad por la DHA como donador de fosfato, son capaces de fosforilar GA con una aceptable eficiencia (Erni *et al.*, 2006). En particular, se ha descrito que la DHAK de la cepa DMS 30040 de *C. freundii* es enantioespecífica para el D-GA (García-Alles *et al.*, 2004).

Con el fin de estudiar si la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 tiene el mismo comportamiento que su homóloga de la cepa DMS 30040 se realizaron varias reacciones de fosforilación usando D,L-GA como sustrato, para su posterior

análisis con dos métodos distintos (ver Materiales y Métodos). La cantidad total de ATP consumido y de ADP formado se valoró mediante HPLC en alícuotas del medio de reacción tomadas a diferentes tiempos (Figura 17R-A).

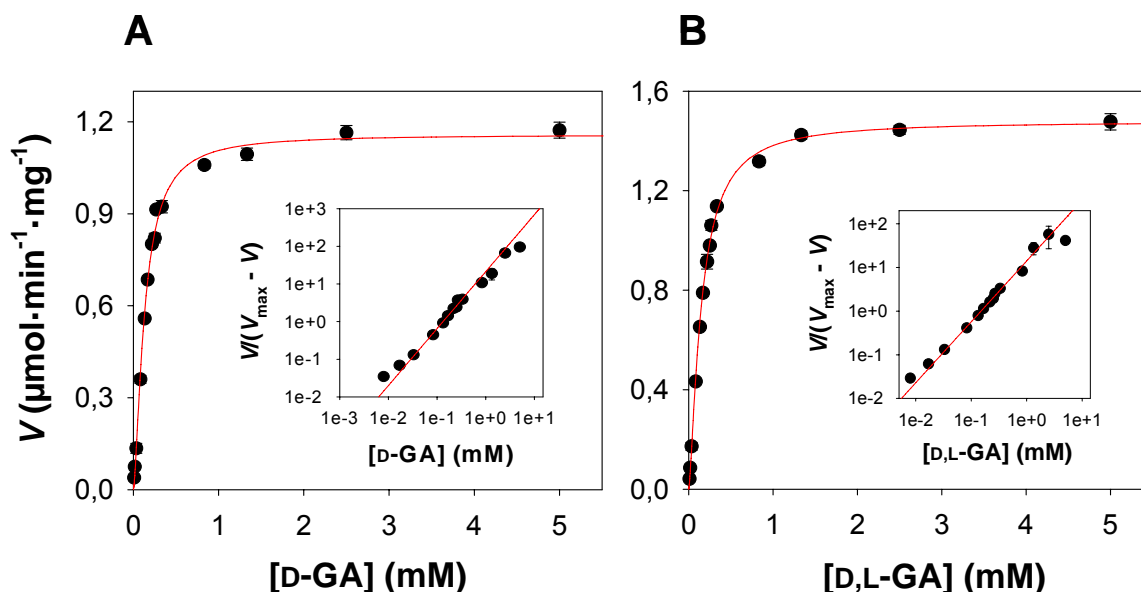


**Figura 17R.** Análisis de la fosforilación de gliceraldehído (A) e hidroxiacetona (B) mediante valoración por HPLC del ATP consumido y ADP formado a distintos tiempos de reacción.

En las mismas alícuotas, se analizó en paralelo la cantidad total de D-gliceraldehído-3-fosfato (D-GA3P) formada, mediante ensayo enzimático acoplado basado en una mezcla de TIM y  $\alpha$ -GDH, puesto que la TIM es estereoespecífica para el enantiómero D. Cruzando los resultados obtenidos con los dos análisis se observó que la cantidad de ATP consumido es mayor que la cantidad de D-GA3P formado, tanto a tiempos cortos como largos de reacción. Esta diferencia indicaría que un porcentaje del L-GA de entre el 30-35 % fue fosforilado por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.

Para un análisis más detallado de la especificidad hacia el GA, se realizaron una serie de estudios cinéticos, basados en dos clases de ensayos de actividad. El primero es el anteriormente mencionado ensayo enzimático acoplado basado en las enzimas TIM y  $\alpha$ -GDH, con el cual se analizaron los parámetros cinéticos con respecto al D-GA. Para el segundo ensayo enzimático acoplado se utilizaron las enzimas piruvato quinasa (PK) y lactato deshidrogenasa (LDH), con los

cuales es posible valorar espectrofotométricamente el ATP total utilizado durante la fosforilación del sustrato, permitiendo obtener los parámetros cinéticos con respecto al total de D,L-GA fosforilado por la DHAK (ver Materiales y Métodos). Los datos obtenidos con los dos sistemas de valoración de la actividad muestran un patrón cinético muy similar en ambos casos (Figura 18R).



**Figura 18R.** Actividad de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en función de la concentración de GA. **A:** Datos cinéticos para el D-GA, obtenidos con el ensayo enzimático basado en  $\alpha$ -GDH y TIM. **B:** Datos cinéticos para el D,L-GA, obtenidos con el ensayo enzimático que emplea PK y LDH. Los insertos muestran la representación de Hill de los datos correspondientes.

Sorprendentemente, la actividad DHAK en función de la concentración de GA muestra un comportamiento sigmoideo en lugar de hiperbólico. El índice de Hill calculado para ambos experimentos fue de 1,5 indicando cooperatividad positiva en la utilización del GA por parte de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. En cuanto a los demás parámetros cinéticos, los valores de  $S_{0,5}$  obtenidos con respecto a D-GA y D,L-GA son muy similares: 0,13 mM y 0,15 mM respectivamente, mientras que las  $k_{cat}$  aparentes calculadas para el racémico es un poco mayor que la calculada para el enantiómero D:  $3,18 \pm 0,85 \text{ s}^{-1}$  frente a  $2,39 \pm 0,67 \text{ s}^{-1}$ .

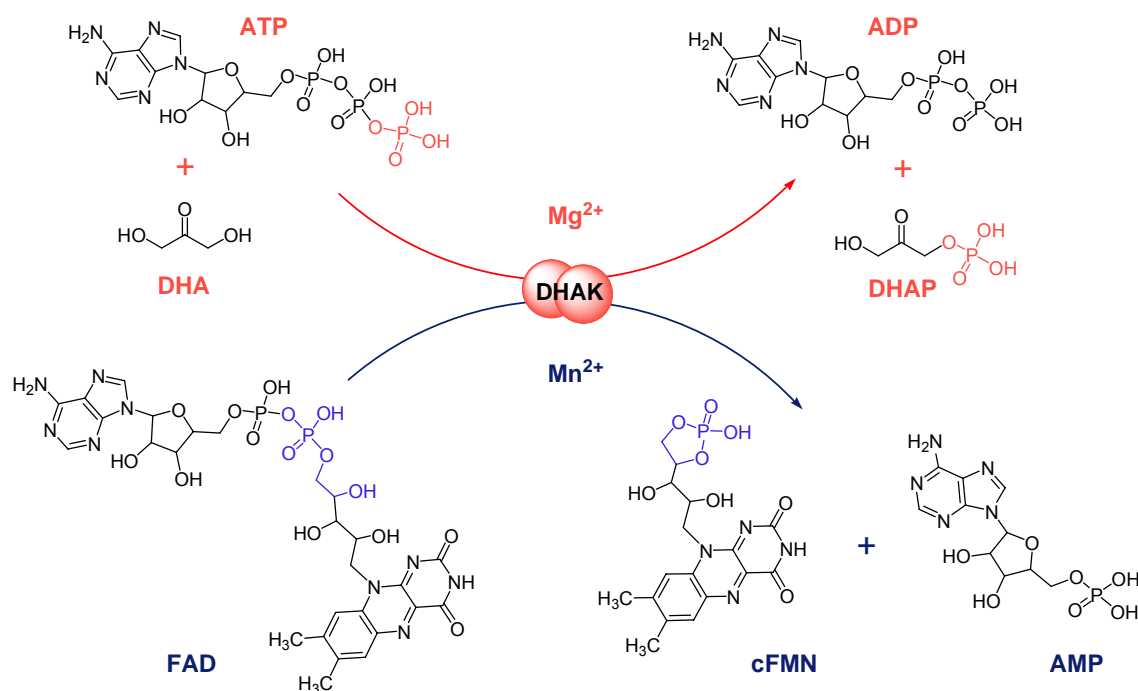
Si bien los datos cinéticos correspondientes al D,L-GA muestran una constante catalítica ligeramente mayor con respecto a la calculada para el D-GA, no se aprecian cambios significativos en los valores de  $S_{0,5}$  calculados para

ambos sustratos, lo cual no es coherente con una fosforilación simultánea casi equivalente de los dos enantiómeros. Sin embargo lo que si demuestran los estudios cinéticos realizados es que el porcentaje del enantiómero L formado no puede ser tan grande como indica el experimento inicial de fosforilación. Con porcentajes de L-GA fosforilado de entre el 30-35 %, las diferencias cinéticas serían mucho más acusadas, manifestadas sobre todo en un descenso de la  $K_M$  o  $S_{0,5}$  para el D-GA con respecto al calculado para el D,L-GA en similares condiciones. Es posible que la diferencia de sensibilidad entre las dos técnicas de valoración utilizadas en el primer experimento (HPLC y ensayo espectrofotométrico) haya sido la responsable de las diferencias tan altas en los grados de fosforilación.

A la luz de los datos totales obtenidos no se puede concluir definitivamente si la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es capaz de fosforilar un cierto porcentaje de L-GA. Serían necesarios más experimentos para verificar si se forma cierta cantidad de L-GA3P a partir de la mezcla racémica del sustrato, aunque a la luz de los resultados es factible que se forme un pequeño porcentaje.

### **PROMISCUIDAD CATALÍTICA DE LA DHAK DE *C. freundii* CECT 4626**

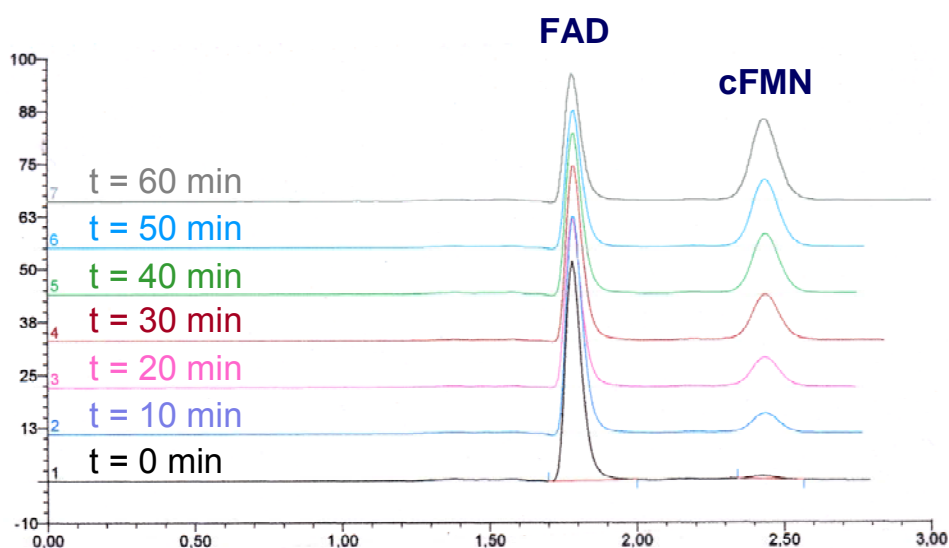
Durante la realización del trabajo de caracterización bioquímica de la nueva variante de DHAK, Camaselle y colaboradores describieron el carácter bifuncional de dos enzimas FAD-AMP liasas, o simplemente FMN-ciclasas: una humana y otra de rata. Estas dos enzimas, además de actividad ciclasa, también poseían una cierta actividad quinasa ATP-dependiente (Cabezas *et al.*, 2005). Estos autores habían publicado previamente una serie de artículos en los cuales identificaban y caracterizaban esta actividad ciclasa  $Mn^{2+}$ -dependiente, así como su producto catalítico: el cFMN (Fraiz *et al.*, 1998; Cabezas *et al.*, 2001; Canales *et al.*, 2005). La FMN-ciclasa humana presenta una identidad de secuencia aminoacídica del 39,4% con respecto a la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, por lo que decidimos investigar si esta nueva variante de quinasa es capaz de catalizar la ciclación del FAD (Figura 19R).



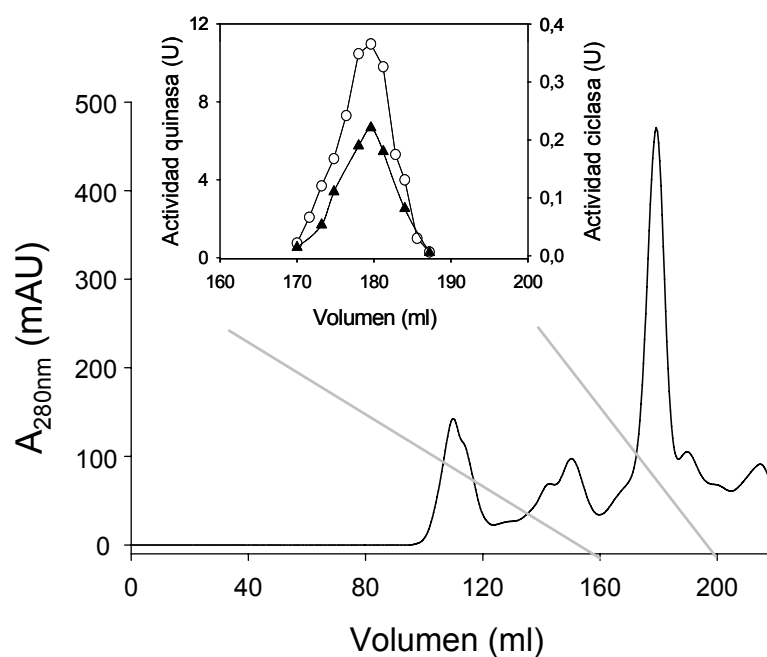
**Figura 19R.** Reacción principal catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 (rojo), y reacción de ciclación promiscua catalizada en presencia de  $Mn^{2+}$  (azul).

Para determinar la posible actividad FMN-ciclase de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se incubó la enzima en presencia de FAD y  $Mn^{2+}$ , y se monitorizó la reacción mediante HPLC (ver Materiales y Métodos). Los cromatogramas registrados a distintos tiempos de reacción mostraron una progresiva disminución en el pico del sustrato FAD y una aparición concomitante de un nuevo pico, cuyo tiempo de retención coincidía con el previamente descrito para el cFMN (Fraiz *et al.*, 1998) (Figura 20R).

El estudio del perfil de elución de las dos actividades durante la purificación de la DHAK, demostraba que la actividad quinasa y la ciclase se co-purifican en proporciones similares, y lo hacían de forma reproducible en diferentes experimentos, indicando que ambas actividades estaban catalizadas por la misma enzima (Figura 21R).



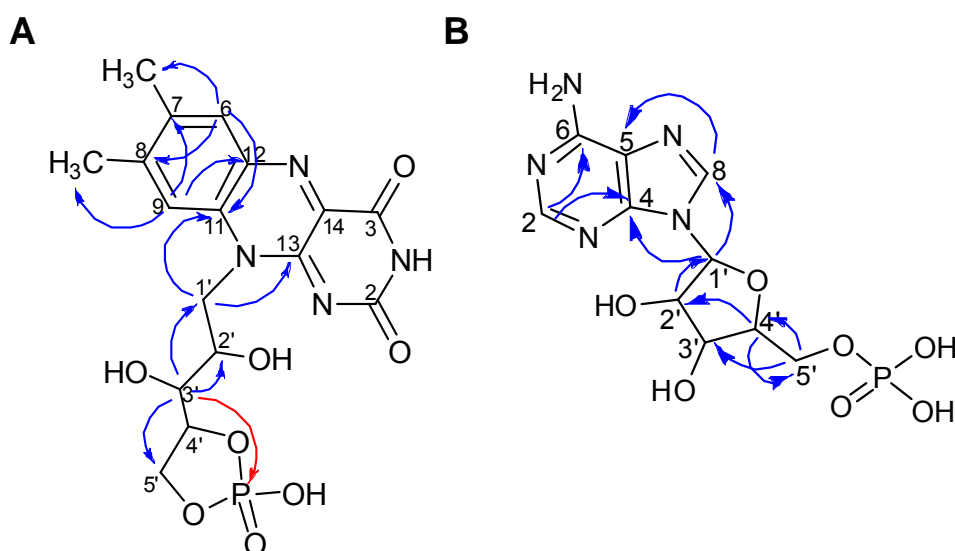
**Figura 20R.** Cromatogramas de HPLC obtenidos a tiempos crecientes de una reacción de ciclación catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.



**Figura 21R.** Cromatograma de la purificación de la DHAK mediante exclusión molecular. El inserto muestra el perfil de actividades quinasa ( $\circ$ ) y ciclasa ( $\blacktriangle$ ) en las fracciones en las cuales fue detectada la enzima mediante SDS-PAGE.

El compuesto asociado con el nuevo pico detectado por HPLC en los ensayos de actividad ciclasa fue purificado e inequívocamente identificado como cFMN, mediante RMN y ESI-MS. La elucidación estructural del producto

purificado se realizó mediante el uso combinado de experimentos de RMN de 1D y 2D. Los espectros monodimensionales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  muestran desplazamientos químicos que pueden considerarse consecuencia de una mezcla de dos productos, en proporciones 4:1 (ver Materiales y Métodos). El compuesto mayoritario fue identificado como riboflavina 4',5'-fosfato cíclica (cFMN). La asignación de la porción molecular correspondiente a la 7,8-dimetilisoaloxazina se realizó basándose en los espectros 1D  $^1\text{H}$ , y 2D gHSQC y gHMBC. Usando la resonancia del C11 como punto de partida, la asignación de todos los protones y carbonos de la cadena lateral ribitol fueron fácilmente obtenidos mediante experimentos gCOSY, gHSQC y gHMBC (Figura 22R).



**Figura 22R.** Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  gHMBC (azúl) y  $^1\text{H}$ - $^{31}\text{P}$  gHMBC (rojo) más relevantes obtenidas para los compuestos mayoritario y minoritario. **A:** riboflavina-4'-5'-fosfato (cFMN). **B:** adenosina-5'-monofosfato (AMP).

La estructura propuesta también es coherente con los ensayos realizados de  $^{31}\text{P}$ -NMR, los cuales muestran una señal bien definida con un desplazamiento químico de 19,20 p.p.m. (relativa a un 85% de ácido ortofosfórico), que es producida por el cFMN, y que se sitúa cercana a otra señal mucho más ancha (de -5 a 10 p.p.m.) producida por el tampón fosfato empleado en el medio de reacción enzimática (ver Materiales y Métodos). La presencia de una constante de acoplamiento  $^3J(^{31}\text{P}, ^{13}\text{C})$  medible para el C3' indica la existencia de un



fragmento de fosfato cíclico. Los datos más relevantes obtenidos mediante RMN se resumen en la Tabla 4R, mostrando una buena concordancia con los previamente descritos en la bibliografía para el cFMN.

**Tabla 4R.** Datos más relevantes de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN ( $\delta$ , ppm) obtenidos en  $\text{D}_2\text{O}$ .

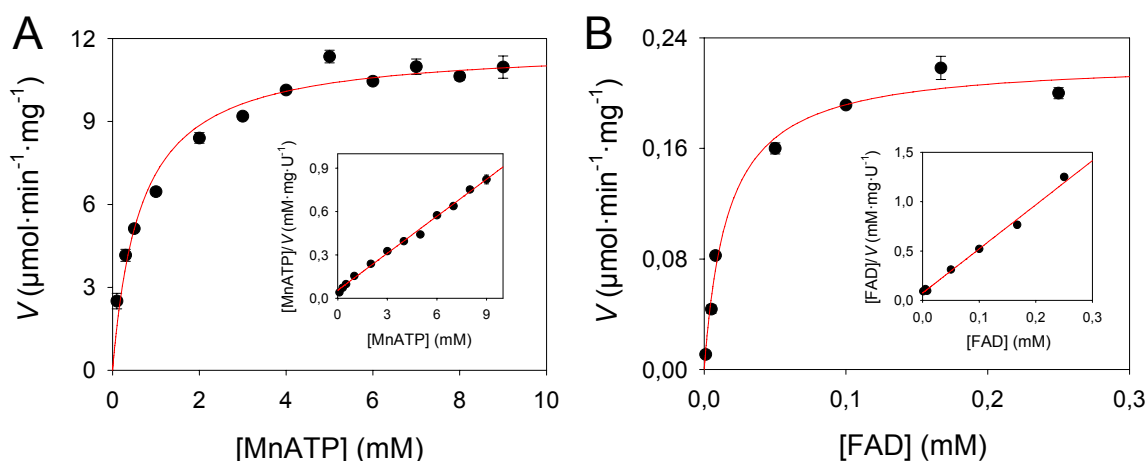
cFMN			AMP		
Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
<i>7,8-dimetilisoaloxazina</i>			<i>Adenina</i>		
2	157,8		2		8,00
4	161,0		4	148,1	
6	130,2	7,46	5	119,1	
7	139,3		6	155,6	
8	150,6		8	140,9	8,12
9	116,7	7,57			
11	131,4				
12	134,2				
13	149,8				
14	133,8				
$\text{CH}_3(\text{C}7)$	18,8	2,22			
$\text{CH}_3(\text{C}8)$	20,7	2,37			
<i>Cadena Ribiti</i>			<i>Ribosa</i>		
1'	47,6	4,58	1'	88,2	5,84
		4,90			
2'	69,3	4,12	2'	73,7	4,56
3'	72,5	3,97	3'	70,5	4,25
4'	75,2	4,56	4'	85,7	4,11
5'	66,3	4,16	5'	61,4	3,74
		4,30			3,66

Finalmente, se realizó la elucidación de la estructura del compuesto minoritario. Los singletes aromáticos a 8,00 y 8,12 p.p.m. y un doblete anomérico a 5,84 p.p.m. fueron detectados en espectros  $^1\text{H}$ . Sólo los carbonos pertenecientes al azúcar fueron observados en el espectro 1D  $^{13}\text{C}$ . Sin embargo, mediante experimentos de gCOSY, gHSQC y gHMBC (Figura 22R-B) la asignación completa del espectro fue posible (Tabla 4R). Así, el compuesto

minoritario fue identificado como adenosina-5'-fosfato (AMP). La presencia minoritaria de AMP en la fracción purificada por HPLC es una confirmación más de la actividad FMN-ciclasa, puesto que esta molécula es el segundo producto generado en la reacción (Figura 19R) que fue copurificada junto al cFMN.

Estos resultados demostraban claramente que la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es una enzima que presenta dos actividades: DHAK ATP-dependiente en presencia de  $Mg^{2+}$  y FMN-ciclasa dependiente de  $Mn^{2+}$ . Sin embargo, para poder hablar *sensu stricto* de promiscuidad catalítica se debe demostrar que ambas reacciones se catalizaban en el mismo centro activo (Kazlauskas, 2005).

El estudio de la posible promiscuidad catalítica se abordó mediante una caracterización cinética de la FMN-ciclasa y su relación con la actividad quinasa principal (Figura 23R). Además, puesto que la actividad ciclasa es  $Mn^{2+}$ -dependiente, se decidió estudiar en profundidad el papel de este catión divalente en la actividad quinasa. Para ello se realizaron nuevos ensayos de actividad quinasa en función del sustrato donador de fosfato, pero empleando en esta ocasión  $Mn^{2+}$  como cofactor, para ensayar la validez como sustrato del complejo MnATP en vez del MgATP previamente estudiado (Figura 23R-B).



**Figura 23R.** Estudios cinéticos realizados sobre las actividades quinasa y ciclasa de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. **A:** actividad quinasa valorada a concentraciones crecientes del donador de fosfato MnATP. **B:** actividad ciclasa determinada a diferentes concentraciones del sustrato FAD. Los insertos muestran las representaciones de Hanes-Woolf empleadas para el cálculo de los parámetros cinéticos.

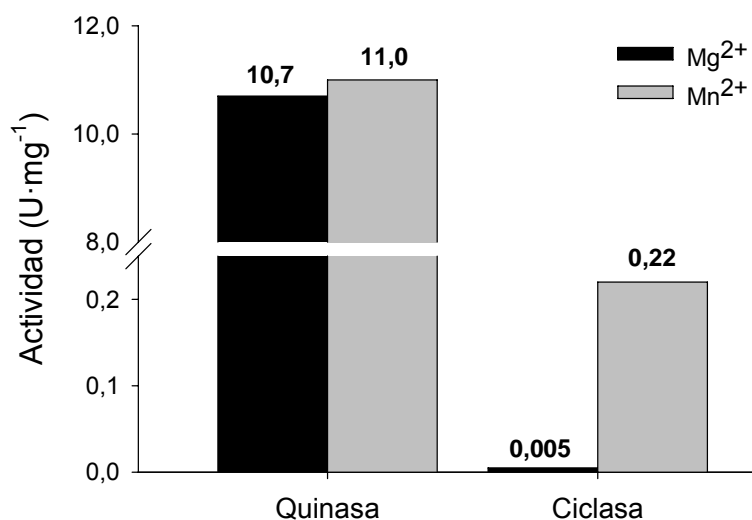
Los parámetros cinéticos calculados con estos nuevos ensayos, así como alguno de los más relevantes obtenidos anteriormente durante la caracterización bioquímica de la actividad quinasa se resumen en la Tabla 5R.

**Tabla 5R.** Resumen de las constantes cinéticas de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 para la actividad natural y promiscua. Los parámetros cinéticos fueron calculados a 25 °C.

Actividad	Sustrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> /M)
Quinasa	DHA	0.0012±0.0003	24.13±0.92	1.98x10 <sup>7</sup>
Quinasa	Mg-ATP	0.35±0.01	24.02±0.37	6.9x10 <sup>4</sup>
Quinasa	Mn-ATP	0.65±0.1	24.84±1.1	3.8x10 <sup>4</sup>
Ciclasa	Mn-FAD	0.017±0.001	0.47±0.02	2.8x10 <sup>4</sup>

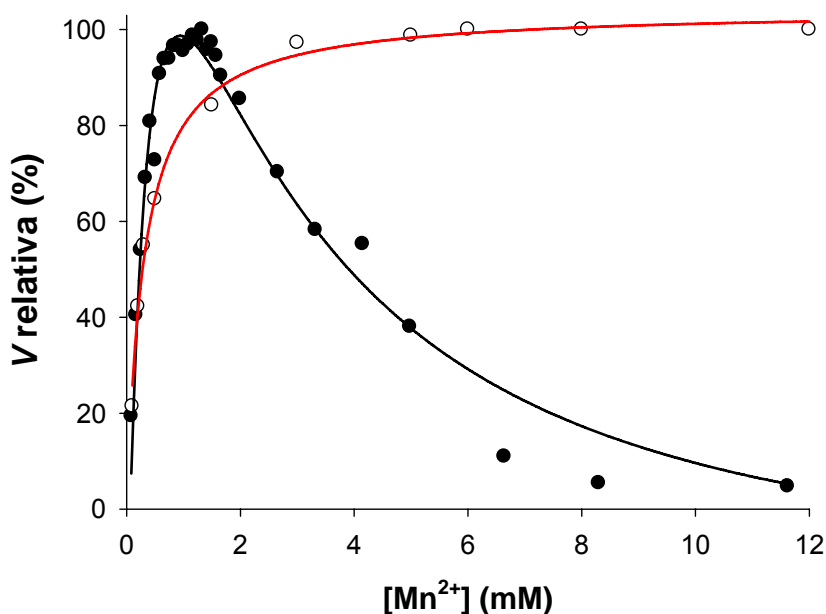
Como se puede observar, la eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 con respecto a los diferentes sustratos fosforilados es del mismo orden de magnitud tanto para la actividad quinasa como para la actividad ciclasa, aunque la constante catalítica es considerablemente superior —del orden de 50 veces—cuando nos referimos a la actividad quinasa.

Sin embargo, estudios más detallados mostraron que las actividades ciclasa y quinasa varían drásticamente en función de si el catión divalente utilizado como cofactor es Mg<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> (Figura 24R). Mientras que la actividad quinasa parece independiente del catión empleado, la actividad ciclasa se incrementa al menos 50 veces cuando el cofactor utilizado es el Mn<sup>2+</sup>.



**Figura 24R.** Actividades específicas valoradas para las reacciones natural y promiscua de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, en presencia de Mn<sup>2+</sup> (■) y Mg<sup>2+</sup> (■). Las actividades fueron medidas a 25 °C con concentraciones de cationes de 12 mM. En la reacción quinasa con Mn<sup>2+</sup> la concentración utilizada fue de 1,35 mM para evitar su inhibición por exceso (ver Figura 25R).

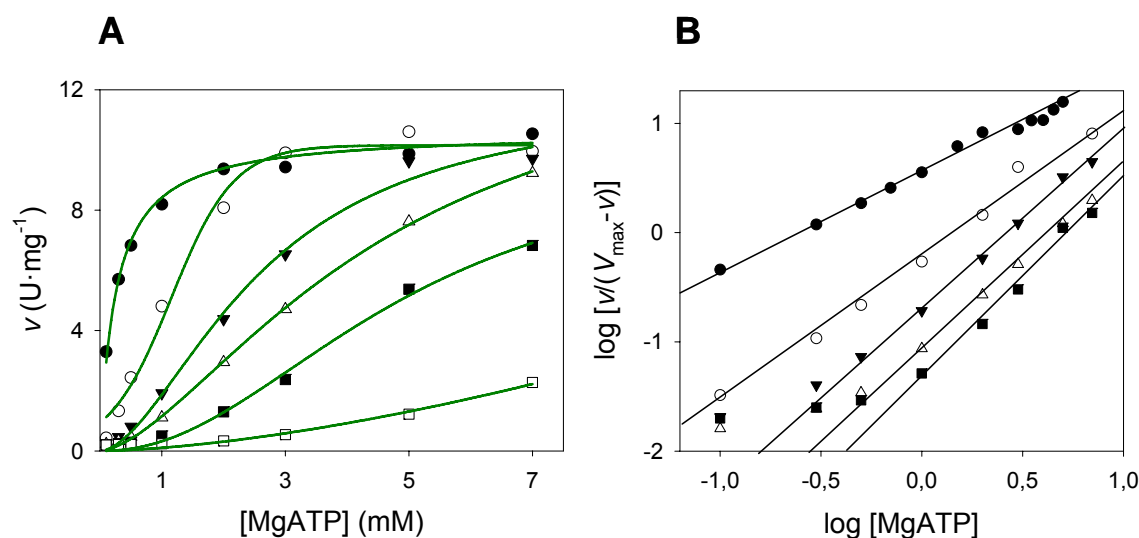
Un análisis más detallado del comportamiento de las dos actividades en función de la concentración de Mn<sup>2+</sup> mostró que, a bajas concentraciones la DHAK es capaz de catalizar tanto la fosforilación de DHA como la ciclación del FAD (Figura 25R). Sin embargo, cuando la concentración de Mn<sup>2+</sup> sobrepasa de 1,5 mM, la actividad quinasa comienza a inhibirse, mientras que la actividad ciclasa se mantiene en saturación a velocidad máxima, sin detectarse efecto inhibitorio al incrementar la concentración de catión. A pesar de que 1,5 mM es una concentración de manganeso mucho mayor que la concentración intracelular de 10 µM, descrita en la bibliografía (Kehres y Maguire, 2003), el sistema de transporte de Mn<sup>2+</sup> en enterobacterias puede incrementar la concentración citoplasmática del metal divalente dos órdenes de magnitud por encima de 1-3 mM en un espacio de tiempo de tan solo un minuto (Kehres *et al.*, 2002; Kehres y Maguire, 2003). Por lo tanto, la concentración citosólica de Mn<sup>2+</sup> podría actuar como un interruptor molecular que apaga la actividad quinasa cuando la actividad ciclasa alcanza su máximo.



**Figura 25R.** Actividades natural y promiscua catalizadas por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en función de la concentración de  $\text{Mn}^{2+}$ . Las actividades quinasa (●) y ciclase (○) se muestran como velocidades relativas para facilitar su comparación.

También se realizaron estudios cinéticos de la actividad quinasa, utilizando como sustrato el complejo Mg-ATP y como inhibidor concentraciones crecientes de  $\text{Mn}^{2+}$ , que permitieron determinar la constante de inhibición para el metal divalente, con un valor de 0,11 mM (Figura 26R-A). Sin embargo, el patrón de inhibición mostrado por el  $\text{Mn}^{2+}$  resultó ser más complejo de lo esperado: se observó un incremento de la sigmoicidad del sistema que pasa de tener un índice de Hill de 1,0 en ausencia de  $\text{Mn}^{2+}$  hasta valores de 2,1 cuando la concentración de catión es 1 mM (Figura 26R-B).

Estos datos podrían indicar un efecto inhibitorio alostérico por parte del  $\text{Mn}^{2+}$ , aunque los estudios actuales son muy preliminares. Serían necesarios experimentos complementarios, modificando las relaciones de los cationes  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , para confirmar esta hipótesis y determinar su posible mecanismo.



**Figura 26R.** Actividad quinasa en función del sustrato MgATP en presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Mn}^{2+}$ : 0,0 mM (●), 0,2 mM (○), 0,4 mM (▼), 0,6 mM (Δ), 1 mM (■) y 2 mM (□). **A:** representación directa de los datos cinéticos. **B:** representación de Hill de los datos cinéticos.

Camesalles y colaboradores han descrito que otros cationes divalentes, especialmente el  $\text{Co}^{2+}$ , son capaces de actuar tan bien e incluso mejor que el  $\text{Mn}^{2+}$  como cofactor en la FMN-ciclasa de rata (Cabezas *et al.*, 2001). Por esta razón se estudió la actividad ciclasa en presencia de otros cationes diferentes a  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Un experimento similar se realizó con la actividad quinasa, durante el proceso de caracterización bioquímica de esta actividad. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6R, así como los previamente calculados para la actividad quinasa, con propósitos comparativos.

**Tabla 6R.** Actividades relativas quinasa y ciclasa obtenidas con diferentes cationes divalentes. La concentración de  $\text{Me}^{2+}$  utilizada fue 0,83 mM para los ensayos de actividad quinasa, y 12 mM para los ensayos de actividad ciclasa.

	Actividad relativa (%)						
	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
<b>Actividad quinasa</b>	100	98	94	0	0	18	44
<b>Actividad ciclasa</b>	4	0,3	100	17	15	177	88

Observando el conjunto de los resultados se observa cómo el patrón seguido por las actividades quinasa y ciclasa en cuanto al cofactor utilizado es

totalmente distinto. Los datos obtenidos para la actividad quinasa son coincidentes con los previamente descritos para FMN-ciclasa de rata en lo referente a la utilización de  $\text{Co}^{2+}$ , siendo mayor la actividad obtenida con este metal divalente. No obstante, debido a su escasa biodisponibilidad intracelular, puede descartarse al  $\text{Co}^{2+}$  como cofactor *in vivo*.

Los resultados obtenidos hasta el momento dejan claro que la presencia de  $\text{Mn}^{2+}$  es necesaria para generar en la DHAK la modificación necesaria para la incorporación del FAD, sustrato de la actividad ciclasa. Esta modificación tan específica que se observa por la sustitución del magnesio por manganeso podría deberse a la mayor flexibilidad que presentan los enlaces ligando- $\text{Mn}^{2+}$ , tanto en su longitud como en el ángulo que forman, lo cual posibilitaría la entrada del FAD en el sitio de unión del ATP (Kehres y Maguire, 2003).

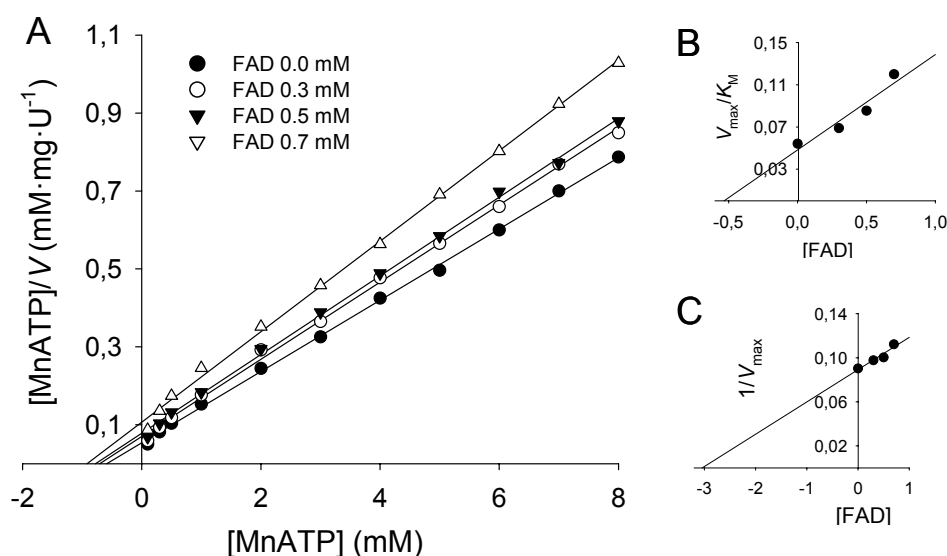
Dada la similitud estructural existente entre ATP y FAD, puesto que ambos comparten el motivo estructural ribosa-fosfato, es lógico asumir que la actividad promiscua debe suceder en el sitio de unión a ATP, situado en el dominio-L de la DHAK. Para corroborar esta hipótesis se realizaron tanto estudios de inhibición como de *docking* molecular (ver Materiales y Métodos). Los resultados de los estudios de inhibición se resumen en la Tabla 7R y demuestran que FAD y ATP compiten por el mismo sitio de unión en la DHAK, puesto que el ATP es un potente inhibidor competitivo de la actividad ciclasa, mientras que la DHA es un pobre inhibidor acompetitivo de esta actividad. Además, el AMP, que es el motivo estructural compartido por FAD y ATP, es un inhibidor competitivo de las dos actividades, quinasa y ciclasa.

Por otro lado, el comportamiento como inhibidor del FAD es más complejo, puesto que muestra un patrón de inhibición mixta en la cual el componente competitivo es mayor que el acompetitivo ( $k_{ic} < k_{iu}$ ) (Figura 27R). Este patrón de inhibición podría explicarse si el FAD se uniese a dos sub-sitios dentro de la proteína: uno de ellos coincidiría con el sitio de unión al ATP, y sería responsable de la unión del motivo AMP del FAD y del factor competitivo de la inhibición, mientras que el otro probablemente sea responsable de la interacción del anillo de isoaloxazina, provocando el factor acompetitivo observado.

**Tabla 7R.** Estudios de inhibición realizados sobre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.

Actividad/sustrato	Inhibidor			
	Tipo de inhibición <sup>[a]</sup> ( $k_i$ mM)			
DHA	ATP	FAD	AMP	
Quinasa/Mg-ATP	<b>N.I</b>	—	—	<b>C</b> (10.2)
Quinasa/Mn-ATP	<b>N.I</b>	—	<b>M</b> ( $k_{ic}=0.5$ ) ( $k_{iu}=3.0$ )	<b>C</b> (71.8)
Ciclase/Mn-FAD	<b>A</b> (576)	<b>C</b> ( $0.2 \times 10^{-3}$ )	—	<b>C</b> (3.52)

[a] **C**: inhibición competitiva; **A**: inhibición acompetitiva; **M**: inhibición mixta; **N.I**: no inhibición.

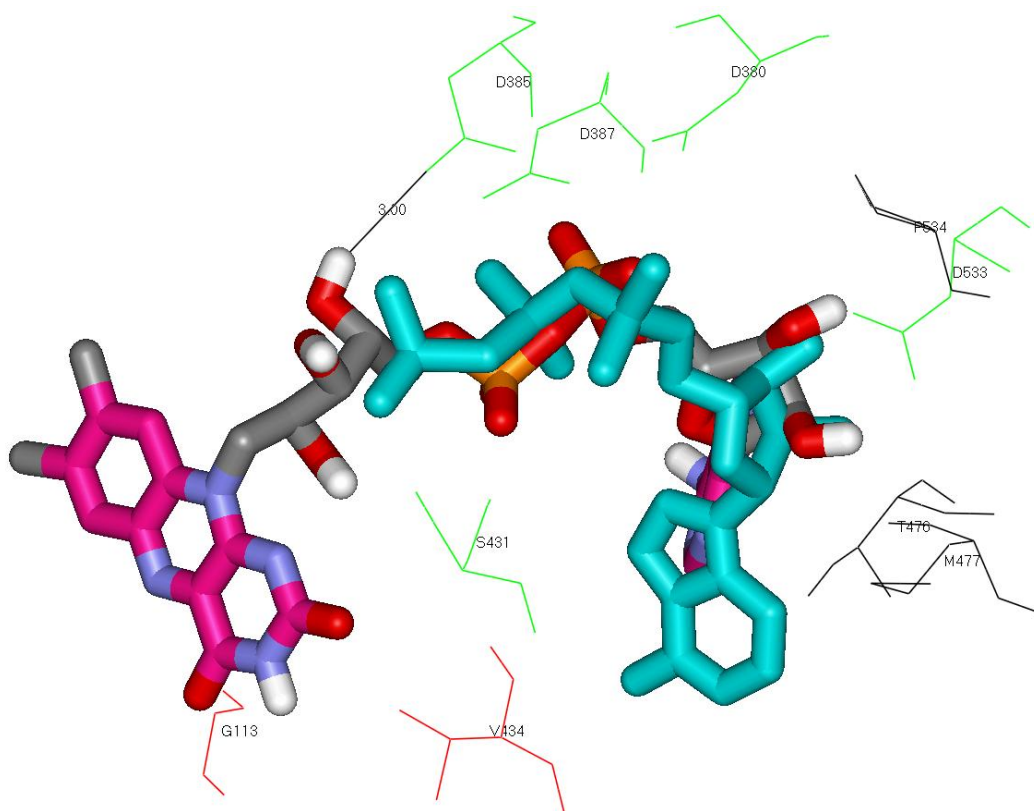


**Figura 27R.** **A**: representación de Hanes-Woolf de los datos cinéticos obtenidos a partir de la actividad quinasa de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, utilizando MnATP como sustrato y distintas concentraciones de FAD como inhibidor. **B** y **C** son las representaciones secundarias utilizadas para calcular  $k_{iu}$  y  $k_{ic}$  respectivamente.

Esta interpretación de los datos de inhibición se corroboró con los resultados obtenidos mediante *docking* molecular. La Figura 28R muestra las interacciones del FAD minimizado en el sitio de unión a ATP de la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 (PDB ID: 1un9; Siebold *et al.*, 2003a).



Los grupos fosfato del FAD se posicionan de forma similar a como lo hacen los fosfatos del ATP en la estructura cristalográfica, los cuales se coordinan mediante dos iones  $Mg^{2+}$  con los grupos  $\gamma$ -carboxilo laterales de tres aspárticos situados en centro activo: Asp380, Asp385 y Asp387. El Asp385 se sitúa a la distancia adecuada para formar un enlace de hidrógeno (3,0 Å) con el grupo hidroxilo –OH(5) del FAD. Este grupo hidroxilo está involucrado en el proceso catalítico necesario para la formación de cFMN, y su interacción con la proteína lo mantiene en la disposición espacial adecuada para que se produzca el ataque nucleofílico al enlace P=O proximal (Cabezas *et al.*, 2001).



**Figura 28R.** Interacción del FAD (coloreado por elementos) y ATP (azul) en el sitio de unión a ATP de la DHAK de la cepa DMS 30040 de *C. freundii* (PDB ID: 1un9), obtenidas mediante *docking* molecular. Aquellos aminoácidos de DHAK que interaccionan tanto con FAD como con ATP se muestran en verde. Los aminoácidos que interaccionan solo con ATP y FAD se muestran en negro y rojo respectivamente.

Hasta la realización del presente trabajo, la única enzima descrita en la bibliografía con actividad FMN-ciclasa lo suficientemente caracterizada a nivel

bioquímico como para establecer comparaciones adecuadas es la localizada en hígado de rata (Cabezas *et al.*, 2001). Los datos cinéticos descritos para la enzima de rata se calcularon a 37 °C, pero los ensayos cinéticos aportados hasta el momento para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 fueron realizados a 25 °C, por lo que fue necesaria la realización de algunos experimentos cinéticos complementarios para establecer una correcta comparación. Concretamente, se calcularon a 37 °C las constantes cinéticas de la actividad ciclasa.

Lógicamente, se observó un incremento de la actividad ciclasa, manifestada en un aumento de la  $k_{cat}$  (Tabla 8R). Lo más interesante de los resultados obtenidos fue que, los parámetros cinéticos descritos para la enzima de hígado de rata (Cabezas *et al.*, 2001) difieren significativamente de los obtenidos para la actividad ciclasa de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Los resultados, que se resumen en la Tabla 8R, indican claramente que la enzima de rata es mucho más eficiente como FMN-ciclasa que la enzima bacteriana. Así, el valor de  $k_{cat}/K_M$  para la enzima de rata es más de un orden de magnitud mayor que el valor calculado para la de *C. freundii*.

**Tabla 8R.** Parámetros cinéticos de la actividad FMN-ciclasa de las DHAKs presentes en *C. freundii* CECT 4626 y en hígado de rata.

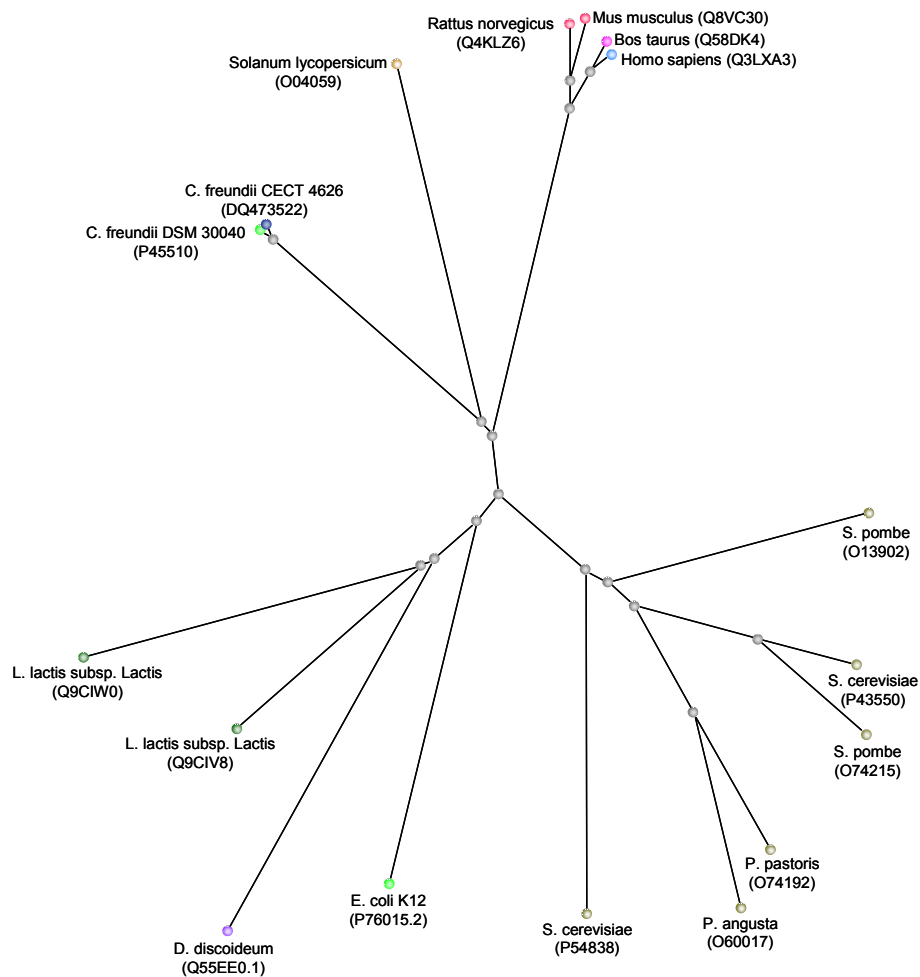
DHAK	Actividad (U·mg <sup>-1</sup> )	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (s <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )
<i>C. freundii</i> CECT 4626 <sup>[a]</sup>	0,5	0,022 ±0,004	0,68 ±0,09	3,1x10 <sup>4</sup>
Hígado de rata <sup>[b]</sup>	3,2	0,009 ±0,001	4,82 ±0,1	5,3x10 <sup>5</sup>

[a] Parámetros cinéticos calculados a 37°C con propósitos comparativos. [b] Parámetros cinéticos obtenidos de Cabezas *et al.*, 2006.

Por otra parte, la enzima presente en hígado de rata posee una actividad dihidroxiacetona quinasa varios órdenes de magnitud mayor que su actividad ciclasa (Cabezas *et al.*, 2006), con lo cual es lógico asumir que se trata de una DHAK presente en mamíferos con promiscuidad catalítica, que ha divergido evolutivamente de las DHAKs presentes en otros organismos como bacterias. La actividad quinasa de la enzima de rata es del mismo orden a la mostrada por

la DHAK de *C. freundii*, indicando que el cambio producido en la actividad promiscua durante el proceso evolutivo no ha afectado significativamente a la actividad principal.

Para una mayor comprensión del proceso evolutivo que han seguido las DHAKs presentes en estos dos organismos tan distantes, realizamos un estudio filogenético a partir de secuencias no redundantes de proteínas confirmadas experimentalmente como DHAKs, cuyas secuencias están depositadas en el banco de datos Swiss-Prot (Figura 29R).



**Figura 29R.** Arbol sin raíz (*unrooted tree*) obtenido mediante análisis de la relaciones de secuencia entre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 y otras DHAKs descritas en la bibliografía. Entre paréntesis se muestra su número de acceso en la base de datos Swiss-Prot.

Sobre la base de su secuencia aminoacídica, las DHAKs de *Citrobacter*, plantas y mamíferos se agrupan en una misma rama (Figura 38R) aunque las

relaciones entre las clases no son significativas en este tipo de árbol filogenético (ver Materiales y Métodos). Nuestros resultados, junto con análisis filogenéticos más exhaustivos descritos en la bibliografía (Erni *et al.*, 2006), sugieren que las enzimas situadas en esta rama han sido sometidas a un proceso de evolución molecular divergente a lo largo del cual la función promiscua ha adquirido una mayor actividad y especificidad. No obstante, para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar detalladamente DHAKs situadas en otras ramas para comprobar si poseen actividad FMN-ciclasa y a qué niveles.

De los múltiples ejemplos existentes en la bibliografía en los que se describe que la sustitución del catión divalente en una metaloenzima da lugar a una nueva actividad promiscua natural (Armstrong, 2000; van de Velde *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002), el caso de la DHAK es el único en el que la actividad promiscua no está relacionada con catálisis de reacciones de oxidoreducción. Hasta la fecha nunca se había descrito una metaloenzima en la cual la sustitución del catión usado como cofactor ( $Mn^{2+}$  por  $Mg^{2+}$ ) modifique una actividad fosfotransferasa convirtiéndola en una actividad tan dispar como la liasa (Bornscheuer y Kazlauskas, 2004; Fernández-Gacio *et al.*, 2006; Okrasa y Kaslauskas, 2006).

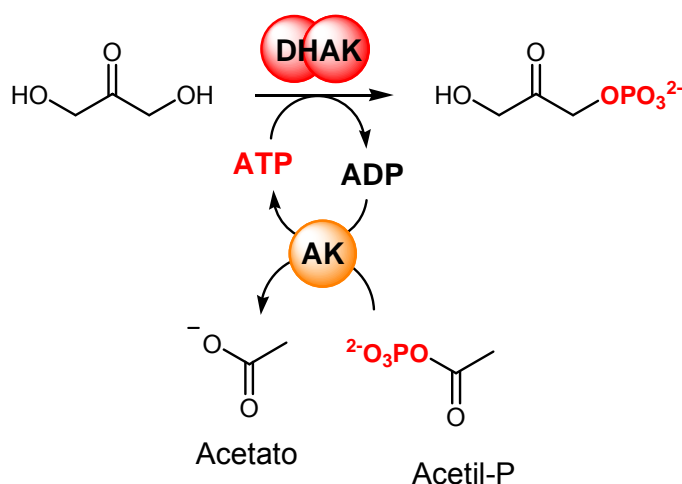
## **APLICABILIDAD SINTÉTICA DE LA DHAK DE *C. freundii* CECT 4626**

Tras la obtención y completa caracterización bioquímica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, se procedió a evaluar su capacidad como biocatalizador para la síntesis enzimática directa de dos compuestos fosforilados interesantes por sí mismos, como son la DHAP y el GA3P. No obstante, el objetivo final de su aplicabilidad sintética reside en la posibilidad de acoplar la obtención *in situ* de DHAP a la acción de diferentes aldolasas dependientes de DHAP, con el fin de obtener un sistema multienzimático para la formación de enlaces C-C que constituya una nueva herramienta biosintética para la obtención de compuestos bioactivos y de interés sintético.

## Producción enzimática de DHAP con regeneración de ATP

El primer problema que se plantea para aplicar la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 a la síntesis de DHAP es la gran sensibilidad que presenta este enzima hacia la inhibición por ADP. Durante la caracterización bioquímica de la enzima se calculó su constante de inhibición con respecto al ADP en 0,12 mM (Tabla 2R), lo cual limita considerablemente su utilización en síntesis al ser fuertemente inhibida por uno de sus productos de reacción. Este hecho se constató durante los primeros ensayos enzimáticos, realizados con cantidades equimolares de DHA y ATP (100  $\mu$ moles), donde apenas se observaba fosforilación del sustrato.

Para solucionar este inconveniente se recurrió a la utilización de un sistema de regeneración de ATP, el cual cumple una doble función: impide la acumulación del inhibidor ADP en el medio de reacción, y permite utilizar el sustrato ATP, un compuesto caro para su empleo en síntesis a gran escala, en cantidades subestequiométricas con el consiguiente beneficio si se utiliza una fuente de fosfato barata para la regeneración. De entre los sistemas de regeneración existentes se eligió el basado en la AK (Figura 30R) debido a las numerosas ventajas que presenta con respecto a otros sistemas.



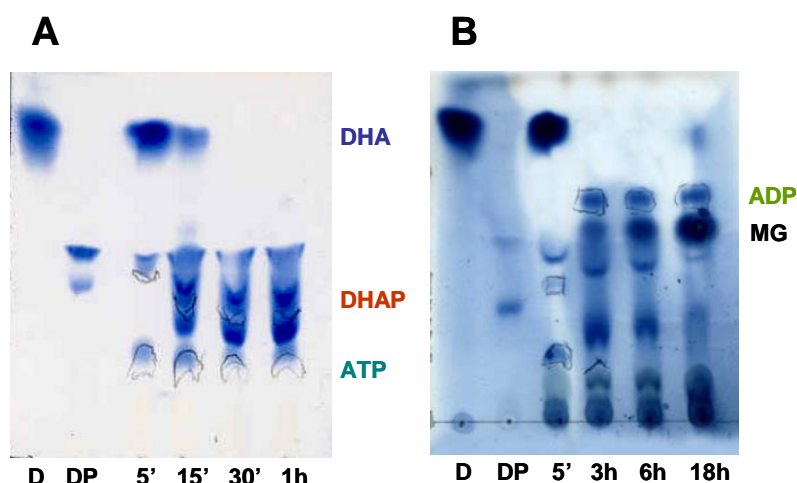
**Figura 30R.** Sistema de fosforilación de DHA catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 con regeneración de ATP mediante la AK de *E. coli*.

Su sustrato, el acetil-P es fácil de sintetizar a partir de ácido fosfórico y anhídrido acético (Crans y Whitesides, 1983) y el acetato sódico que se genera

como producto es un compuesto volátil y medioambientalmente compatible. Además, tanto enzima como sustrato están disponibles comercialmente lo cual facilita la puesta a punto inicial del sistema sintético.

La eficiencia sintética de la DHAK se evaluó siguiendo la fosforilación a lo largo del tiempo de DHA, con una cantidad limitante de ATP, y el sistema de regeneración basado en la AK de *E. coli*. Las reacciones se siguieron de dos formas: mediante TLC, observándose la desaparición de DHA ( $R_f = 0,82$ ) y aparición de DHAP ( $R_f = 0,31$ ) a lo largo del tiempo, y mediante ensayos enzimáticos de valoración de DHAP a distintos tiempos de reacción (ver Materiales y Métodos). Para los ensayos de optimización de sistema se empleó una cantidad fija de DHA de 100  $\mu$ moles, con respecto a la cual se ensayaron tres proporciones limitantes de ATP: 50, 30 y 15 veces menos. Tan solo se observó formación del producto fosforilado con cantidades de ATP 15 veces menores a las del sustrato inicial, por lo que se tomó esta proporción como correcta para la aplicación sintética del enzima.

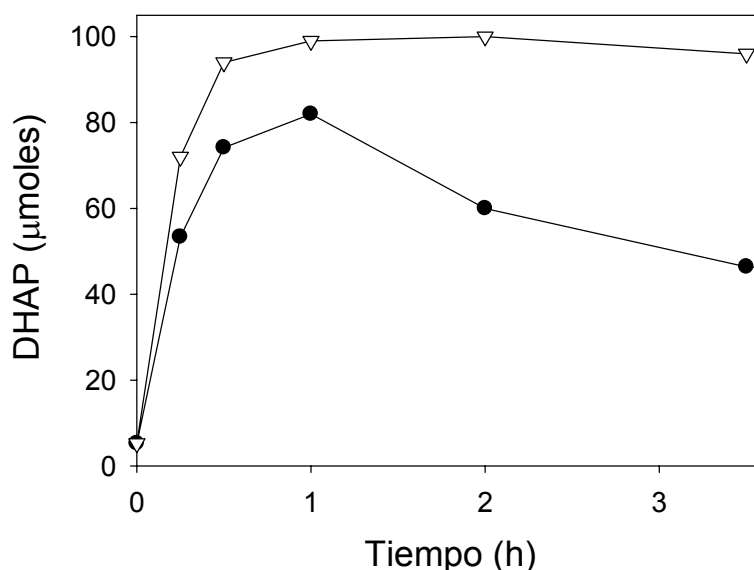
En las primeras reacciones del proceso de optimización, el porcentaje de conversión de DHA a DHAP no superó en ningún momento el 40%. Además, se observó una acidificación del medio de reacción en paralelo a formación de DHAP. Realizando diferentes controles se observó que la acidificación del medio se debía a la acción de la AK del sistema de regeneración, pues cataliza la formación de acetato a partir de acetil-P con liberación de  $H^+$  al medio, que llega a alcanzar valores de pH de 5,0. Analizando mediante TLC diferentes alícuotas de reacción se observó que con la acidificación del medio el sistema de regeneración no funcionaba, y el ADP se acumula (Figura 31R).



**Figura 31R.** Seguimiento de una reacción de fosforilación de DHA, empleando la enzima DHAK de *C. freundii* CECT 4626. **A:** tiempos cortos de reacción donde se observa la acumulación progresiva de DHAP. **B.** tiempos largos de reacción en los cuales la DHAP generada se degrada progresivamente a metil-glioxal (MG), y el ADP se acumula por la falta de regeneración de ATP. Se usaron como marcadores disoluciones de DHA (D) y DHAP (DP).

Este hecho es explicable porque la AK de *E. coli* tiene un pH óptimo de funcionamiento de 7,6 y es muy sensible a sus variaciones, por lo que la acidificación del medio interfiere en la correcta regeneración del ATP. Ajustando y manteniendo durante toda la reacción el pH en valores próximos a 7,5 se obtuvieron acumulaciones de DHAP del 82 % transcurrida 1 hora y en las condiciones especificadas. Si se prolonga el tiempo de reacción, la DHAP del medio va disminuyendo, dando lugar a un producto observable mediante TLC como una nueva mancha ( $R_f = 0,7$ ) y que fue identificado como metil-glioxal, el principal compuesto de degradación de la DHAP en medios neutros y básicos (Suau *et al.*, 2005) (Figura 31R-B).

Con el fin de incrementar el rendimiento final de la fosforilación, se realizaron nuevos ensayos en los cuales se incrementó la cantidad de DHAK en el medio de 3 a 6 U por reacción. Con este aumento se lograron rendimientos en la acumulación de DHAP siempre cercanos al 100% en intervalos de tiempo que variaban entre los 30 minutos y 1h (Figura 32R). Al ser la reacción mucho más rápida no se producía degradación de la DHAP acumulada en el medio de reacción.



**Figura 32R.** Fosforilación de DHA con sistema de regeneración de ATP, empleando como catalizador distintas cantidades de DHAK de *C. freundii* CECT 4626: reacción con 3 U de enzima y ajuste continuo del medio a pH 7,5. (●) y reacción con 6 U y manteniendo un pH de 5,0 cuando la reacción alcanzó el 100 % de acumulación de DHAP (Δ).

El sistema optimizado para la fosforilación de DHA se ha utilizado en multitud de reacciones, siempre con excelentes rendimientos de acumulación de DHAP, cercanos al 100 %, incluso a mayores escalas de reacción. De forma habitual se han utilizado reacciones a escala de entre 1 y 3 mmoles de sustrato, aunque se ha llegado a utilizar puntualmente a escalas de 10 mmoles con idéntico resultado, lo cual supone la obtención de cantidades de producto de hasta 1,8 g.

Sin embargo, su principal inconveniente es la purificación del producto. Se han utilizado diversos métodos para la purificación, tales como el intercambio iónico o la precipitación con sales de  $\text{Ba}^{2+}$ , pero en todos los casos se produce una considerable degradación de la DHAP en el proceso, así como una co-purificación con restos de acetil-P presentes en el medio de reacción. No obstante, se ha observado que la DHAP generada puede conservarse durante largos periodos de tiempo (meses) congelada en el mismo medio de reacción, ajustado a pH ácido en torno a 5 sin que se observe degradación alguna. Dado el alto rendimiento de la reacción enzimática, en el medio final sólo hay DHAP, restos de acetato, fosfato (el acetil-P se descompone al acidificar el medio de reacción), tampón y restos de  $\text{Mg}^{2+}$ , así como pequeñas concentraciones de



ATP, pues se utilizó siempre en cantidades subestequiométricas. Como detallaremos más adelante, la DHAP obtenida mediante esta síntesis enzimática se puede utilizar directamente sin necesidad de ninguna purificación adicional en reacciones catalizadas por aldolasas dependientes de DHAP.

### **Producción enzimática de GA3P con regeneración de ATP**

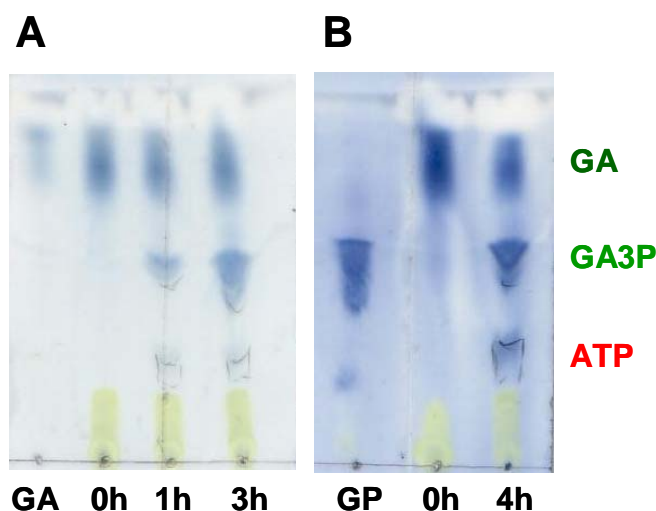
Durante la caracterización bioquímica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se demostró que el GA puede actuar como aceptor de fosfato en reacciones catalizadas por esta enzima. No obstante, el GA es mucho peor sustrato que la DHA, lo cual se manifiesta en el valor de la constante catalítica  $k_{cat}$  calculado, que es unas 8 veces mayor para el aceptor natural, siendo la eficiencia catalítica con respecto a la obtenida para el GA unas 1.000 veces mayor (Tabla 2R).

Por esta razón, para aplicar la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 a la síntesis enzimática de GA3P fue necesario incrementar la cantidad de enzima con respecto a las reacciones optimizadas para la obtención de DHAP. Por lo general, para la síntesis enzimática de GA3P se utilizaron cantidades de DHAK de entre 5 y 8 veces superiores a las empleadas con la DHA como sustrato, siendo la relación más común la de 25 U de enzima por cada 100  $\mu$ moles de sustrato. Para la obtención de GA3P se utilizó como sustrato la mezcla racémica D,L-GA, a partir de la cual se obtuvo el producto fosforilado.

Una de las incógnitas que no pudo ser resuelta durante la caracterización bioquímica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 fue la especificidad hacia el enantiómero del GA que actúa como donador de fosfato para la enzima. Nuestros resultados indicaban que podría fosforilarse un pequeño porcentaje de L-GA, aunque los estudios cinéticos realizados no eran concluyentes en ese sentido. Por esta razón, la síntesis del producto fosforilado a mayor escala supuso una posibilidad para aclarar este punto, purificando el GA3P resultante y analizando su isomería óptica.

Para la síntesis enzimática de GA3P se siguieron dos estrategias, variando

las relaciones iniciales de los reactivos acetil-P y D,L-GA, con el fin de maximizar el rendimiento final de la reacción, así como obtener la menor cantidad de subproductos fosforilados que pudieran interferir en el proceso de purificación posterior. Las dos estrategias consistieron en utilizar un exceso de acetil-P con respecto al D,L-GA (1,6 equivalentes), o bien utilizar en exceso en D,L-GA con respecto al acetil-P (2 equivalentes). Las reacciones se monitorizaron mediante el ensayo de valoración de GA3P (ver Materiales y métodos) así como mediante TLC (Figura 33R). Con las dos aproximaciones se lograron moderados rendimientos máximos de acumulación de GA3P —61% y 40% respectivamente tras 4 horas de reacción—, que se repitieron tanto a escala de 100  $\mu$ moles de D,L-GA en el proceso de optimización, como a escala de 1 mmol, en las reacciones empleadas para la purificación del producto.



**Figura 33R.** Seguimiento de una reacción de fosforilación de GA, empleando la enzima DHAK de *C. freundii* CECT 4626. **A:** reacción en la cual se utilizó un exceso de D,L-GA de 1,6 equivalentes con respecto al acetil-P. **B:** reacción en la cual se utilizó un exceso de acetil-P de 2 equivalentes con respecto al D,L-GA. Se usaron como marcadores GA y GA3P (GP).

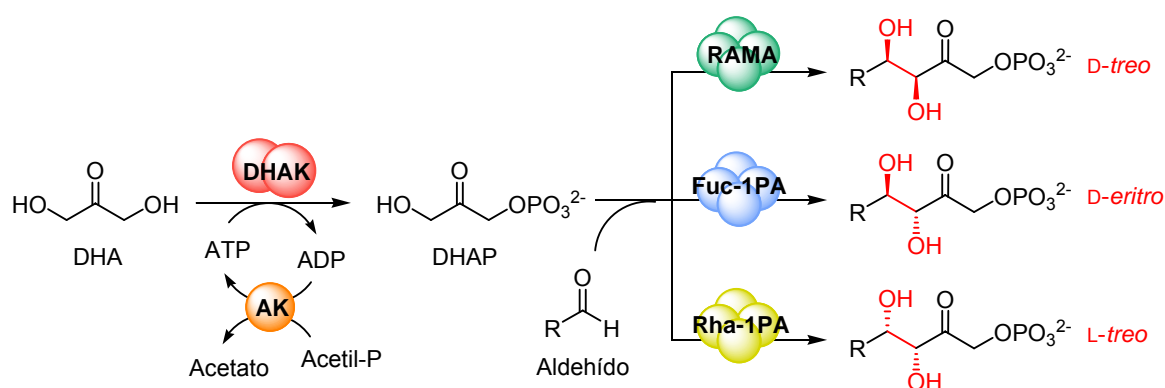
Para la purificación del producto se ensayaron dos métodos de purificación: intercambio iónico y precipitación con sales de  $\text{Ba}^{2+}$ , pero en ambos casos se produce una considerable degradación del GA3P en el proceso, así como una co-purificación con restos de acetil-P presentes en el medio de reacción y detectados mediante IES-MS. Por lo tanto, al no obtenerse el GA3P

completamente puro no fue posible su análisis óptico para determinar la enantioespecificidad de la DHAK.

Si bien el problema para la purificación del GA3P es similar al planteado para la síntesis enzimática de DHAP, sus ventajas también son las mismas: se ha observado que el GA3P producido puede conservarse durante largos periodos de tiempo congelado en el mismo medio de reacción, ajustado a pH ácidos en torno a 5 sin que se observe degradación alguna. Así pues, al igual que la DHAP, esto permite su posterior empleo directo en reacciones químicas y enzimáticas en las cuales no interfieran los productos generados durante la síntesis, por ejemplo como sustrato para determinadas aldolasas.

### Sistema multienzimático acoplado para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.

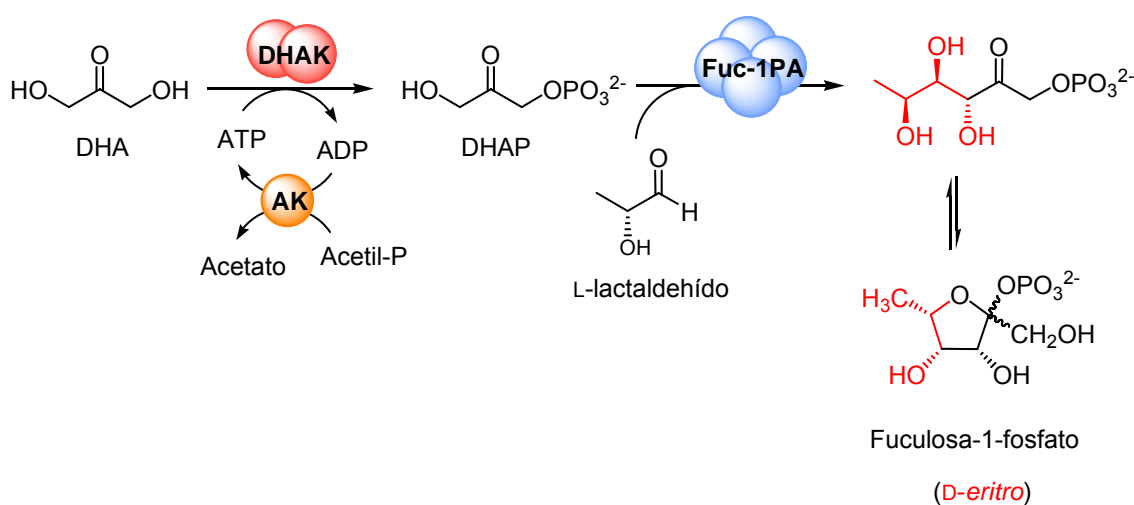
Una vez optimizadas las condiciones para un correcto funcionamiento de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, con el sistema de regeneración de ATP, se acopló la formación *in situ* de DHAP con la adición aldólica, catalizada por tres de las aldolasas dependientes de DHAP: Fuc-1PA y Rha-1PA de *E. coli*, así como con RAMA, una FBPA presente en músculo de conejo (Figura 34R).



**Figura 34R.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP, generada *in situ* por fosforilación de DHA, y distintos aldehídos, catalizada por tres aldolasas dependientes de DHAP.

Un factor determinante para alcanzar el máximo rendimiento en la síntesis del aldol correspondiente es el ajuste de la velocidad a la que se forma la DHAP con la velocidad a la que es utilizada por la aldolasa. Si la DHAP se produce más rápido de lo que es empleada por la aldolasa, se acumulará en el medio de reacción y se producirá su degradación parcial, disminuyendo la cantidad final de aldol producido y generando subproductos no deseados. Para ello deben tenerse en cuenta dos aspectos: (i) el pH debe mantenerse a pH 7,5 mediante ajuste continuo del mismo para asegurar el funcionamiento del sistema de regeneración de ATP y (ii) la relación entre las actividades aldolasa/DHAK debe ajustarse experimentalmente para prevenir la acumulación de DHAP y así minimizar su degradación al pH neutro en el que se desarrolla la reacción. Así, la relación de actividades aldolasa/DHAK se determinó empíricamente.

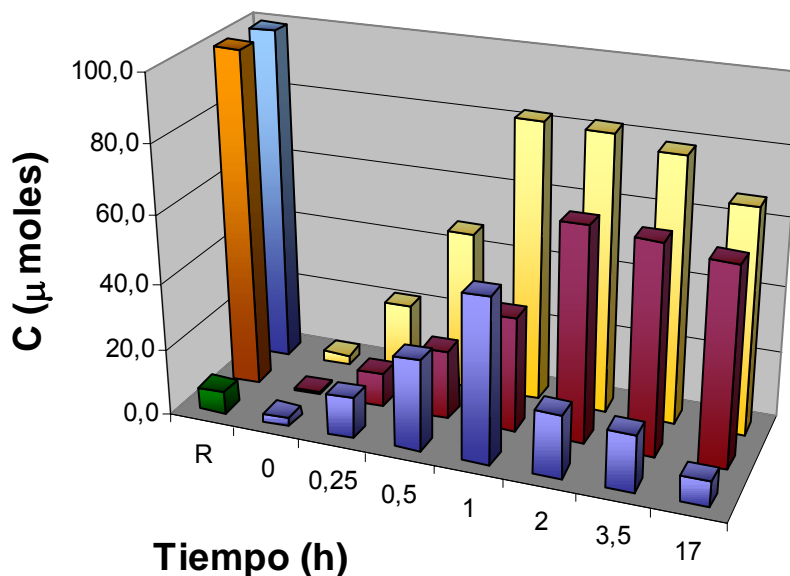
El sistema multienzimático se desarrolló inicialmente con la Fuc-1PA y utilizando como aceptor su sustrato natural, el L-lactaldehído (Figura 35R).



**Figura 35R.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP y L-lactaldehído, catalizada por la Fuc-1PA.

En un principio, se utilizó un exceso de actividad quinasa para garantizar el aporte continuo de DHAP a la aldolasa, por lo que se eligió una relación de actividades Fuc-1PA/DHAK de 1/3. Además, se utilizó una cantidad equimolar de DHA y L-lactaldehído. El máximo rendimiento de formación de fuculosa-1-fosfato (Fuc-1P) fue del 63%, transcurridas 2 h de reacción, mientras que la

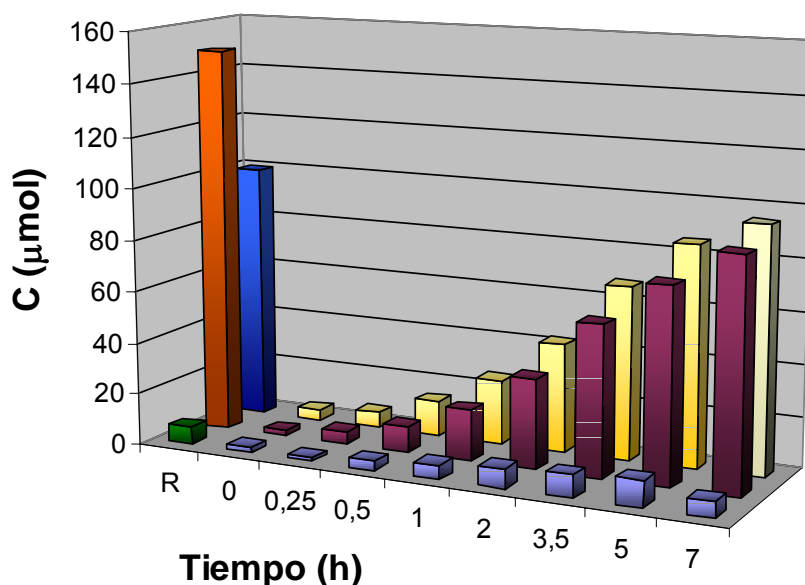
máxima acumulación de DHAP (48,8  $\mu$ moles) se alcanzó en 1 h, y decreció significativamente a tiempos superiores (Figura 36R).



**Figura 36R.** Seguimiento de la reacción catalizada por el sistema multienzimático Fuc-1PA/DHAK, con una relación de actividades 1/3. R: reactivos de partida; ATP (■), L-lactaldehído (■) y DHA (■). Productos de la reacción: DHAP (■), fuculosa-1-fosfato (■) y la suma de ambos productos (■).

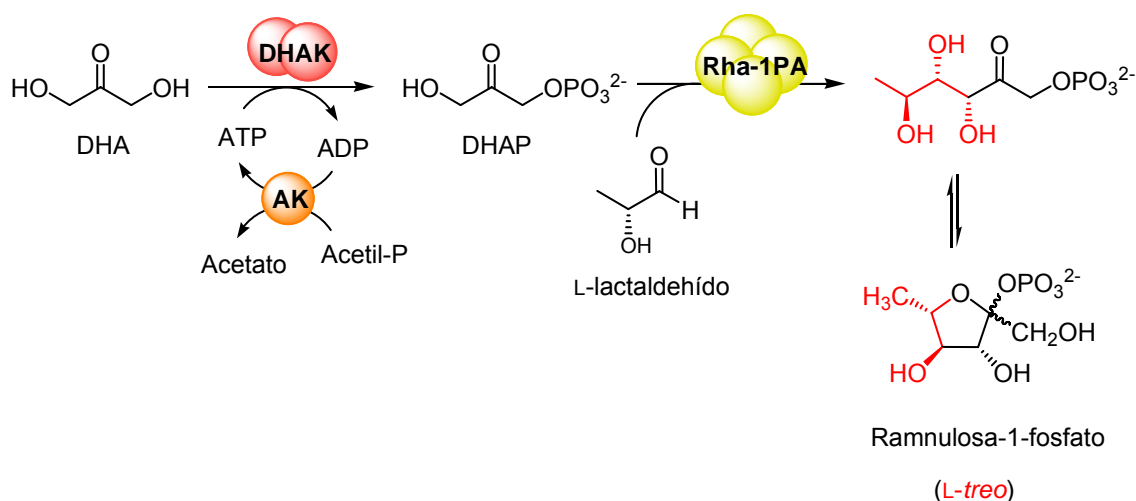
Estos resultados indicaban que la DHAP se producía más rápido de lo que se consumía, lo que conllevaba su acumulación y degradación. Para disminuir la velocidad de formación de la DHAP la relación de actividades Fuc-1PA/DHAK se aumentó a 1/1,5. En estas condiciones la DHAP acumulada nunca superó los 5-10  $\mu$ moles, lográndose rendimientos en la formación de Fuc-1P superiores al 80%, lo cual indicaba un buen ajuste en la relación de los enzimas del sistema. Por otra parte, este rendimiento se mejoró cuando la reacción se llevo a cabo con un exceso de L-lactaldehído de 1,5 equivalentes con respecto a la DHA, obteniéndose acumulaciones de aldol cercanas al 89% (Figura 37R).

Con las condiciones optimizadas, se pudieron reproducir los resultados obtenidos en reacciones a mayor escala, partiendo de 1 mmol de DHA. La Fuc-1P obtenida en el proceso fue purificada mediante cromatografía de intercambio iónico y analizada mediante  $^{13}\text{C}$  RMN, obteniéndose espectros coincidentes con los previamente descritos la bibliografía (Liu *et al.*, 1991).



**Figura 37R.** Seguimiento de la reacción optimizada, catalizada por el sistema multienzimático Fuc-1PA/DHAK, con una relación de actividades 1/1,5 y exceso de L-lactaldehído. **R:** reactivos de partida; ATP (■), L-lactaldehído (■) y DHA (■). Productos de la reacción: DHAP (■), fuculosa-1-fosfato (■) y la suma de ambos productos (■).

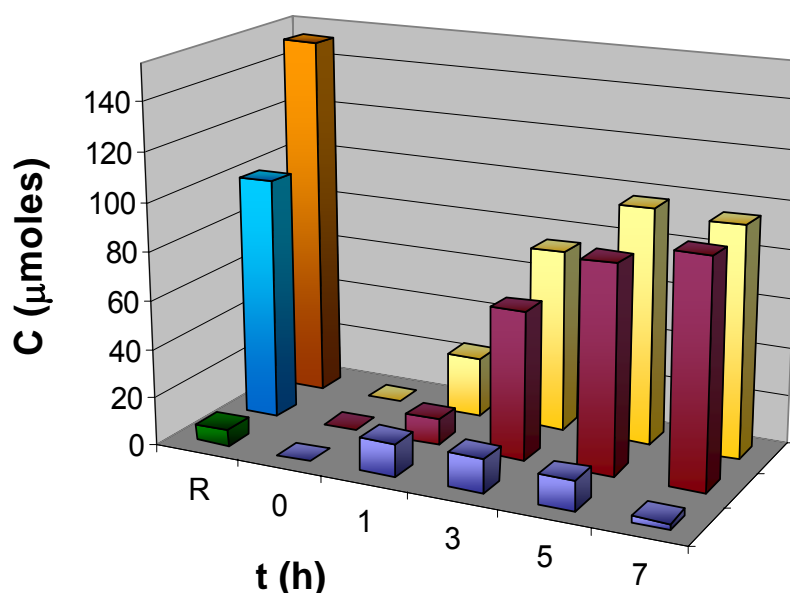
La segunda aldolasa que fue acoplada a la síntesis *in situ* de DHAP con sistema multienzimático fue la Rha-1PA (Figura 38R).



**Figura 38R.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP y L-lactaldehído, catalizada por la Rha-1PA.

Utilizando las condiciones previamente optimizadas con Fuc-1PA a las

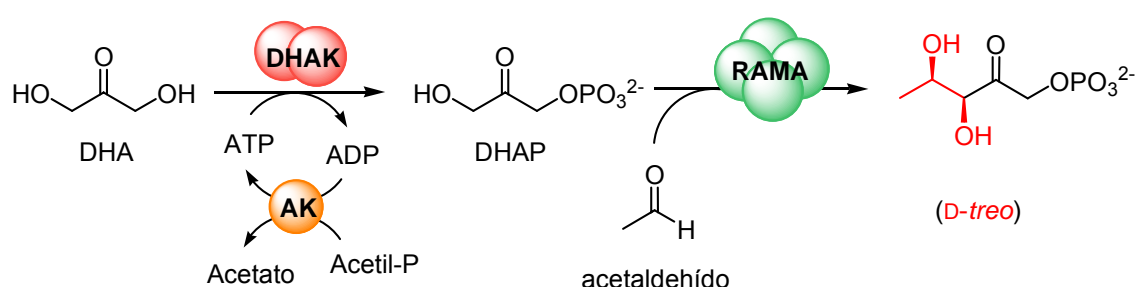
reacciones de adición aldólica con la Rha-1PA se consiguieron rendimientos en la formación de aldol que superaban el 80%, aunque no se detectó acumulación de DHAP durante el transcurso de la reacción. Para asegurarnos de que la formación de la DHAP no estaba siendo el paso limitante de la reacción, se incrementó la cantidad de DHAK a 1,7 unidades. En estas condiciones pudimos observar una pequeña acumulación de DHAP, inferior al 5%, acompañada de un ligero aumento en la formación de ramnulosa-1-fosfato (Rha-1P), que superaba el 90% (Figura 39R). Así, decidimos considerar 1/1,7 como la relación óptima para las reacciones que utilizan Rha-1PA.



**Figura 39R.** Seguimiento de la reacción optimizada, catalizada por el sistema multienzimático Rha-1PA/DHAK, con una relación de actividades 1/1,7 y exceso de L-lactaldehído. R: reactivos de partida; ATP (■), L-lactaldehído (■) y DHA (■). Productos de la reacción: DHAP (■), ramnulosa-1-fosfato (■) y la suma de ambos productos (■).

Bajo estas condiciones optimizadas se realizó la síntesis de Rha-1P a escala de 1 mmol, tal y como se había realizado previamente para la Fuc-1P. La Rha-1P se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y los datos obtenidos mediante  $^{13}\text{C}$  RMN fueron coincidentes con los previamente descritos (Liu *et al.*, 1991).

La última aldolasa que acoplamos al sistema multienzimático fue la FBPA (Figura 40R). Como fuente de FBPA se utilizó la aldolasa de músculo de conejo, RAMA, pues es comercialmente accesible y una de las más estudiadas en cuanto a su aplicación en síntesis enzimática (Iturrate y García-Junceda, 2008). Para la optimización del sistema multienzimático con RAMA se utilizó el acetaldehído como sustrato aceptor, puesto que su aceptor natural es el D-GA3P, un sustrato caro y de difícil acceso. Además el acetaldehído ha sido descrito como un buen sustrato de RAMA (Bednarski *et al.*, 1989).

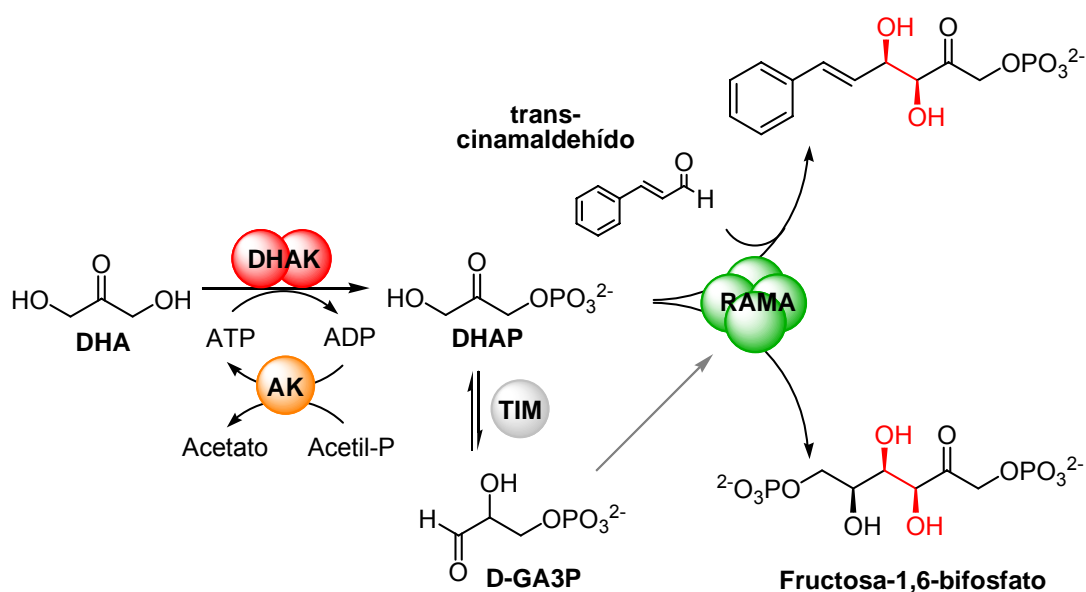


**Figura 40R.** Sistema multienzimático acoplado para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP y acetaldehído, catalizada por RAMA.

Durante las primeras reacciones con el sistema RAMA/DHAK se utilizó una relación de actividades 1/1,5 similar a la previamente optimizada para la Fuc-1PA. En estos primeros ensayos se obtuvieron altos rendimientos de formación de aldol, mientras que la acumulación de DHAP en el medio era realmente baja e incluso inexistente. Estos excelentes resultados se mantenían independientemente del aldehído utilizado como sustrato. Al ensayar la reacción con el trans-cinamaldehído (Figura 41R) obtuvimos una formación de aldol del 79% respecto a la DHA en 7h, un resultado sorprendente puesto que las características de este aldehído ( $\alpha,\beta$ -insaturado y aromático) lo situaban como un mal sustrato de RAMA, en base a la caracterización sintética previa del enzima (Bednarski *et al.*, 1989). La caracterización por RMN del aldol obtenido no mostró las señales correspondientes al anillo aromático y sólo permitió detectar como producto mayoritario la inesperada formación de fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) (Gray y Barker, 1970).



Está descrito en bibliografía (Dinkelbach *et al.*, 2001) que la aplicación de las aldolasas dependientes de DHAP es muy sensible a la presencia de contaminación por triosafofato isomerasa (TIM) ya que este enzima cataliza la isomerización de la DHAP a D-G3P. Este aldehído puede ser sustrato de la aldolasa y dar lugar a la formación de un aldol no deseado, y mucho más en el caso de RAMA, pues el D-GA3P es su sustrato aceptor natural (Figura 41R).



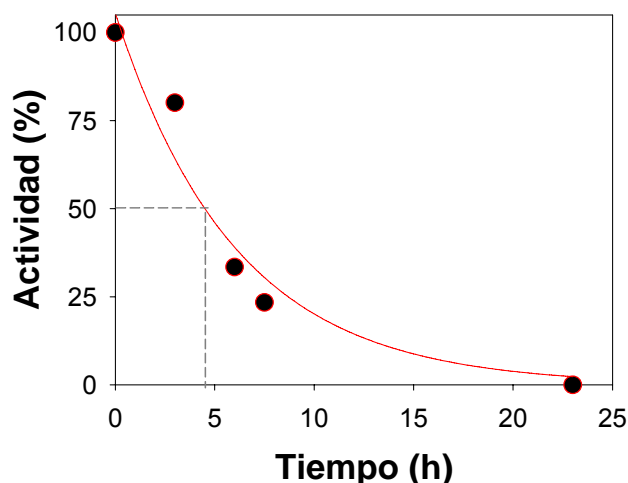
**Figura 41R.** Reacción enzimática de formación de fructosa-1,6-bisfosfato en presencia de TIM.

En un principio, se había descartado la contaminación de TIM en las purificaciones de las distintas enzimas utilizadas, ya que en ningún momento se detectó mediante SDS-PAGE una banda correspondiente al peso del monómero de TIM de *E. coli* (Riley *et al.*, 2006). No obstante, TIM es uno de los enzimas más eficientes que existen e incluso una cantidad inapreciable de esta proteína puede interferir seriamente en el proceso sintético catalizado por las aldolasas. Así, fue necesario realizar distintos ensayos control para determinar el origen de la contaminación por TIM en nuestro sistema. Estos ensayos se realizaron incubando DHAP comercial y RAMA en condiciones similares a las empleadas con el sistema multienzimático, pero en ausencia de aldehído, de tal forma que la aparición de aldol a lo largo del tiempo indica claramente la presencia de contaminación por TIM (ver Materiales y Métodos).

De esta forma, se pudo determinar que el origen de la contaminación por TIM estaba en la preparación de la DHAK. Hasta ese momento, la DHAK se purificaba en un único paso por IMAC con elución con imidazol, pero a partir de este punto se incluyó un segundo paso de purificación por exclusión molecular, tal y como se indica en el apartado de Resultados dedicado a la purificación de la enzima. La repetición de los controles de contaminación por TIM con la DHAK purificada mediante este nuevo protocolo permitió comprobar la eliminación de dicha contaminación. Del mismo modo se analizaron las reacciones llevadas a cabo con Fuc-1PA y Rha-1PA, para determinar si los resultados obtenidos podían deberse a contaminación por TIM. La no-detección de aldol durante el tiempo de incubación descartó una posible contaminación por TIM en las aldolasas purificadas y confirmó que si existe esta contaminación, el posible D-GA3P formado no es sustrato de las aldolasas ensayadas.

Una vez solucionada la presencia de contaminación con TIM, se reanudó la optimización del sistema RAMA/DHAK. Utilizando condiciones de reacción libres de TIM la relación de actividades 1/1,5 no funcionó; se observó una considerable acumulación de DHAP en el medio pero la cantidad de aldol generada fue nula, transcurrida una hora de reacción. Por esta razón se decidió incrementar la relación de actividades RAMA/DHAK a 4/1. Bajo estas nuevas condiciones la DHAP acumulada se redujo a 23  $\mu$ moles (23% con respecto a la DHA inicial), y el aldol producido aumentó hasta 9  $\mu$ moles (un 9%) después de una hora de reacción. A tiempos de reacción mayores, la acumulación de DHAP se incrementó progresivamente, sin embargo la cantidad de aldol permaneció constante, indicando la necesidad de incrementar la relación de actividades RAMA/DHAK.

Los resultados obtenidos hasta ese momento apuntaban hacia un problema de inestabilidad de RAMA en la reacción. Por tanto se realizó un estudio de la estabilidad de la enzima en las condiciones del sistema multienzimático que determinó una vida media de RAMA de 5 horas (Figura 42R). A la vista de estos resultados, se decidió añadir mayor cantidad de RAMA desde el inicio de la reacción, así como añadir una cantidad equivalente transcurridas 3 horas.

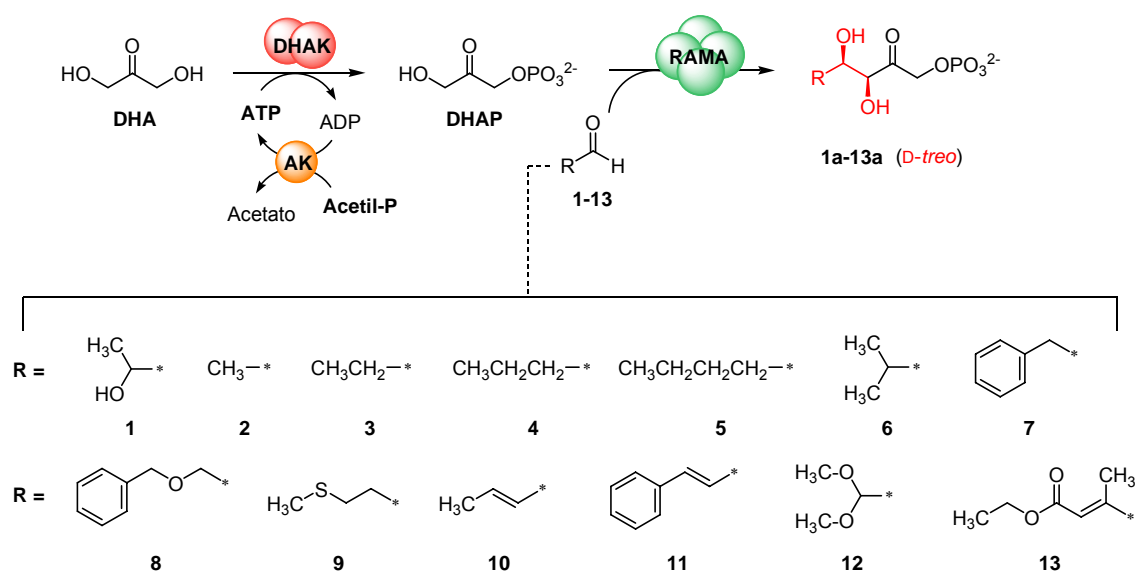


**Figura 42R.** Estabilidad de la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa de músculo de conejo (RAMA) bajo las condiciones del sistema multienzimático, descritas en Materiales y Métodos.

Después de varios incrementos en la proporción RAMA/DHAK se determinó como óptima una relación de actividades de 11,5/1 añadiendo una cantidad de RAMA igual a la inicial transcurridas 3 horas de reacción. Con estas nuevas condiciones se alcanzó una acumulación de aldol en el medio de reacción de 53  $\mu$ moles (un 53% con respecto a la DHA inicial), y aunque se realizaron ensayos posteriores con mayor cantidad de aldolasa no se observó incremento de aldol producido. Es importante recordar que la optimización del sistema se realizó con el acetaldehído, que no es el sustrato natural de la aldolasa, lo cual demuestra el importante efecto que ejerce el aldehído utilizado en el sistema multienzimático, siendo necesario un reajuste de las relaciones de actividad en función de la naturaleza del sustrato empleado. Como prueba cabe destacar que la obtención de FBP en las primeras reacciones, contaminadas con TIM, se llevó a cabo con excelentes rendimientos, siendo necesario tan solo una relación de actividades 1/1,5 puesto que RAMA disponía de su sustrato natural: el D-GA3P (Figura 41R).

## Estudio de la aplicabilidad sintética del sistema multienzimático para la síntesis de enlaces C-C

La aplicabilidad sintética del sistema multienzimático, optimizado para su uso con tres aldolasas dependientes de DHAP se evaluó ensayando 13 aldehídos, representativos de una amplia diversidad estructural (Figura 43R), como sustratos para la formación de diferentes aldoles. Puesto que el estudio de aplicabilidad concerniente a las aldolasas Fuc-1PA y Rha-1PA ha formado parte del trabajo de Tesis Doctoral de la Dra. Laura Iturrate (Iturrate, 2008), en la presente Tesis se recoge el estudio de la aplicación del sistema multienzimático para la obtención de una amplia diversidad de aldoles, empleando RAMA como aldolasa acoplada a la síntesis *in situ* de DHAP (Figura 43R).

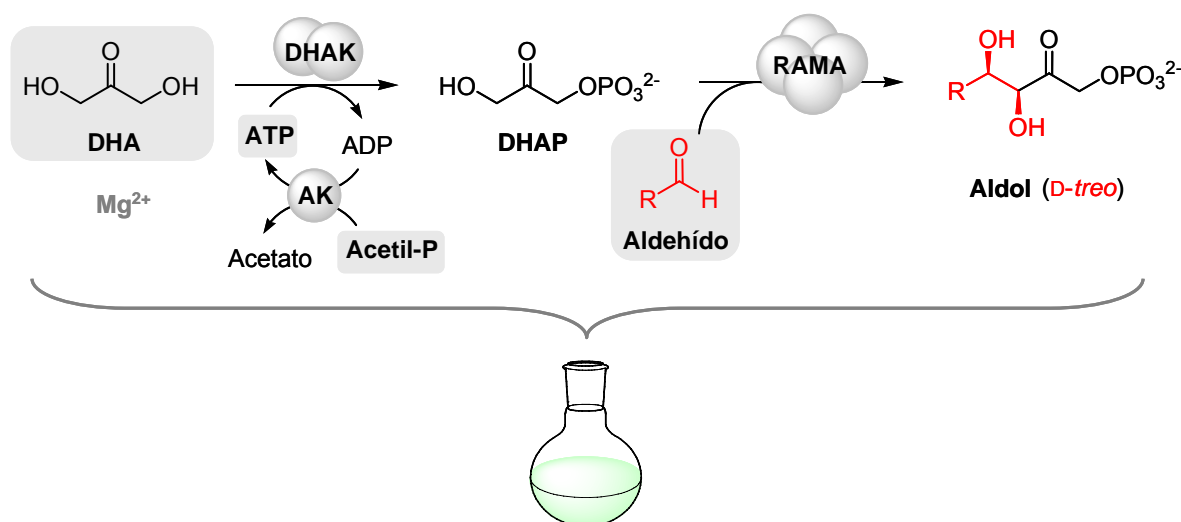


**Figura 43R.** Sistema multienzimático acoplado DHAK/RAMA para la formación de enlaces C-C mediante reacción aldólica entre DHAP, generada *in situ* por fosforilación de DHA, y distintos aldehídos con una amplia diversidad estructural.

### Estrategia de reacciones en un único paso

Como primera aproximación, el sistema multienzimático se ensayó en una estrategia en un solo paso. Para esta estrategia se incluyen desde el principio todos los componentes necesarios para la síntesis enzimática en el medio de

reacción, tanto los necesarios para la fosforilación de DHA como los requeridos para la adición aldólica (Figura 44). Los resultados obtenidos con esta estrategia para el sistema DHAK/RAMA se encuentran resumidos en la Tabla 9R y se pueden agrupar en 3 categorías:



**Figura 44R.** Representación esquemática de la estrategia en un paso. Los componentes del sistema DHAK/RAMA añadidos desde el inicio al medio de reacción se resaltan en gris.

**1).** Aquellos en los que el sistema de fosforilación de la DHA funcionó correctamente, con un consumo de DHA entre el 95% y el 100%, y el porcentaje de formación de aldol fue de moderado a bueno (rendimiento superior al 25%). A esta categoría pertenecen las reacciones con los aldehídos **2, 4, 5, 8, 9 y 12**.

**2).** Aquellos donde la fosforilación de la DHA fue casi completa (95-100%) pero el rendimiento de formación de aldol fue de moderado a pobre (inferior al 25%). A esta categoría pertenecen las reacciones con los aldehídos **3, 6 y 10**.

**3).** Aquellos donde la fosforilación de DHA fue inferior al 90% o incluso donde no tuvo lugar. A esta categoría pertenecen las reacciones realizadas con los aldehídos **7, 11 y 13**.

**Tabla 9R.** Resultados del sistema multienzimático DHAK/RAMA.

Aldehído	Estrategia en un paso		Estrategia en dos pasos	
	1a-13a [%]	Conversión DHA [%]	1a-13a [%]	Conversión DHA [%]
<b>2</b>	53,2	98,0	66,0 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>3</b>	7,8	97,4	4,5	95,0
<b>4</b>	63,3	95,0	61,5 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>5</b>	52,2	96,0	62,2 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>6</b>	10,8	98,2	9,6	95,0
<b>7</b> <sup>[a],[c]</sup>	0,0	0,0	58,9 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>8</b> <sup>[b]</sup>	70,6	97,1	73,1 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>9</b>	32,1	98,0	70,0 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>10</b>	1,5	99,4	4,1	95,0
<b>11</b> <sup>[c]</sup>	1,7	22,8	3,2	100,0
<b>12</b>	70,5	95,1	81,0 <sup>[d]</sup>	100,0
<b>13</b>	7,4	61,8	57,0 <sup>[d]</sup>	100,0

[a] El benzaldehído comercial utilizado se encuentra en una dilución al 50% en alcohol bencílico, lo que resulta en una concentración final en el medio de reacción del 3,3%. [b] 10% DMSO. [c] 5% DMSO. [d] Aldoles purificados y caracterizados mediante RMN.

Los resultados de la segunda categoría, donde el sistema de fosforilación funcionó correctamente pero los rendimientos de formación de aldol fueron bajos, pueden deberse a que estos aldehídos sean pobres sustratos de RAMA. Por otro lado, en los resultados de la tercera categoría, no es posible discernir si estos aldehídos son buenos o malos sustratos de la aldolasa ya que, al no funcionar el sistema de fosforilación, el aporte de DHAP es el factor limitante del sistema. El no funcionamiento del sistema de fosforilación puede estar motivado por una interferencia de los propios aldehídos o de algún otro componente del

medio de reacción con el sistema multienzimático, inhibiendo y/o inactivando a la DHAK o a la AK. Por ejemplo, la presencia del alcohol bencílico en la mezcla de reacción del aldehído **7** o el uso de DMSO como co-disolvente con el aldehído **11** podría justificar los resultados obtenidos con estos compuestos.

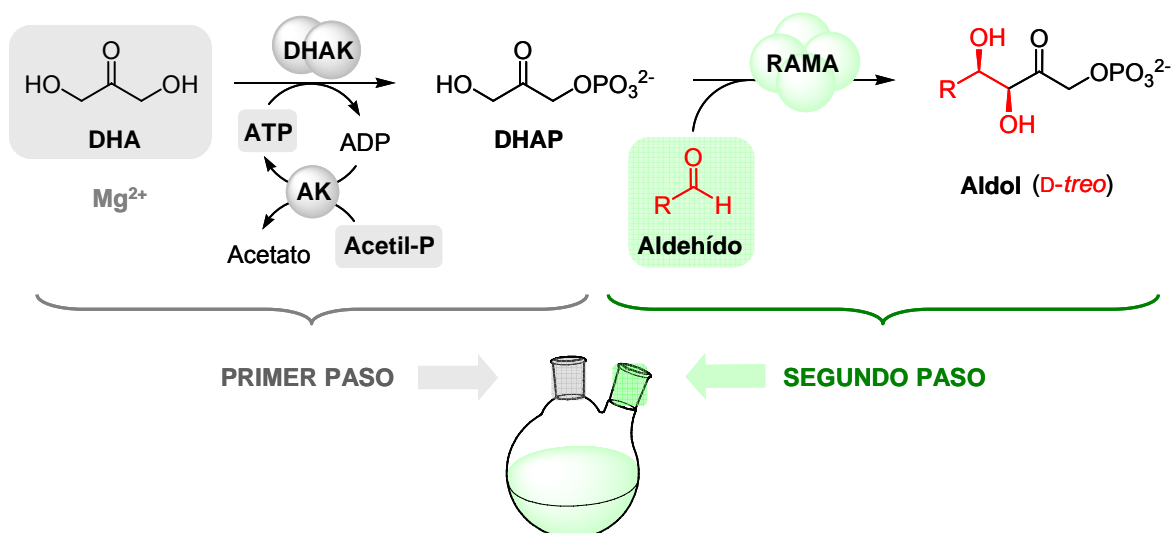
Durante el estudio de la aplicabilidad sintética del sistema multienzimático acoplado a las aldolasas Fuc-1PA y Rha-1PA (Iturrate, 2008) se determinó que los resultados de las reacciones pertenecientes a esta tercera categoría mejoraban sustancialmente cuando se aplicaba una estrategia en dos pasos, generando primero la DHAP en el medio y acoplándola después a la acción de las aldolasas. Además se observó que los rendimientos de algunas reacciones pertenecientes a la segunda, e incluso a la primera categoría, mejoraban ligeramente con este tipo de estrategia. Por esta razón se decidió ensayar ese mismo procedimiento en dos pasos con en el sistema multienzimático DHAK/RAMA.

### **Estrategia de reacciones en dos pasos**

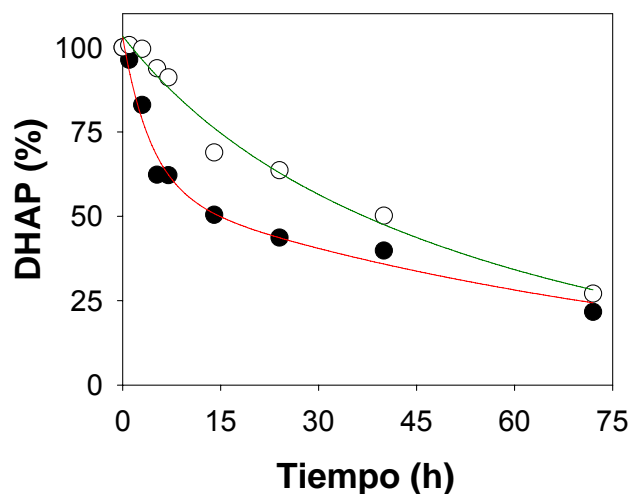
En la estrategia en dos pasos, al comienzo de la reacción sólo están presentes los componentes necesarios para la fosforilación enzimática de la DHA, incluyendo el sistema de regeneración de ATP. De esta forma, se posibilita la acumulación de DHAP en el medio de reacción. Cuando la fosforilación de la DHA supera el 95%, el pH se acidifica hasta 6,8 y se añaden el aldehído y la aldolasa para que, en un segundo paso, tenga lugar la adición aldólica (Figura 45R).

Son dos los factores clave para un correcto funcionamiento de las reacciones con la estrategia en dos pasos. En primer lugar, la fosforilación de DHA debe ser lo más rápida posible para minimizar el tiempo de permanencia de la DHAP en un medio con un pH de 7,5 en el cual es inestable. En segundo lugar, cuando se ha acumulado la suficiente cantidad de DHAP, esto es, cuando se alcanza un nivel de fosforilación de DHA superior al 95%, el pH del medio debe ajustarse inmediatamente a 6,8. A este valor de pH la estabilidad de la DHAP se incrementa considerablemente (Figura 46R), y las aldolasas dependientes de

DHAP como RAMA funcionan perfectamente en estas condiciones, siendo posible llevar a cabo el segundo paso de la estrategia minimizando la pérdida del sustrato, puesto que esta etapa se suele prolongar varias horas.



**Figura 45R.** Representación esquemática de la estrategia en dos pasos. Los componentes del sistema DHAK/RAMA utilizados en el primer paso se resaltan en gris, mientras que los necesarios para la consecución del segundo paso se resaltan en verde.



**Figura 46R.** Efecto del pH en la estabilidad de una disolución de DHAP (0,1 M). Se realizaron dos reacciones tamponadas a pH 7,5 (●) y 6,8 (○) y la DHAP se valoró enzimáticamente.

Los resultados obtenidos con la estrategia en dos pasos se resumen en la Tabla 9R. El uso de esta estrategia permitió recuperar la funcionalidad del



sistema multienzimático en las reacciones de la tercera categoría, en las cuales se observó un aumento en la formación de aldol. Por ejemplo, en la reacción con el aldehído **13** como aceptor, la formación del aldol aumentó del 7,4% al 57%. En el caso de la reacción con el aldehído **11** la formación de aldol se incrementó ligeramente, pasando del 1,7% al 3,2%, lo cual indica que no es un buen sustrato de RAMA. También es destacable el resultado obtenido con el aldehído **7** como aceptor, donde la estrategia en un paso no funcionó mientras que la estrategia en dos pasos permitió una formación de aldol del 59%. En estas reacciones, en las que la estrategia en un único paso no era viable, la estrategia en dos pasos permitió una notable mejoría en la formación de aldol.

En cuanto a las reacciones con aldehídos de la segunda categoría, no se observó una mejora con respecto a la estrategia en un solo paso. Sólo con el aldehído **10** se incrementó ligeramente la formación de aldol, del 1,5% al 4%. Con los otros dos aldehídos de este grupo (**3** y **6**) la cantidad final de aldol se redujo ligeramente, aunque manteniéndose en valores muy similares. Estos resultados indican que una elevada concentración de DHAP en el medio de reacción no mejora la adición aldólica catalizada por RAMA cuando se emplean aldehídos que son malos sustratos del enzima.

Por el contrario, en las reacciones con aldehídos de la primera categoría la elevada concentración de DHAP en el medio produjo un interesante incremento en la formación de aldol. Tan solo la reacción en dos pasos con el aldehído **4** no mostró incremento en la cantidad de aldol producido con respecto a la estrategia en un paso. Con todos los demás se aumentó la formación de aldol, entre los que cabe destacar la reacción con el aldehído **9** donde el rendimiento final pasa de 32% a 70%, más del doble de aldol acumulado. También son importantes los incrementos del 10% conseguidos con los aldehídos **2**, **5** y **12**, mientras que con el aldehídos **8** el aumento de aldol con este sistema es del 3%.

Una vez optimizadas las estrategias en uno y dos pasos catalizadas por RAMA se decidió aplicar el sistema multienzimático a la síntesis de varios de los aldoles ensayados, pero con reacciones a una escala mayor, partiendo de 0,3 mmoles de sustrato. Estas reacciones solo se llevaron a cabo con aquellos aldehídos que se pueden considerar buenos sustratos de RAMA, es decir,

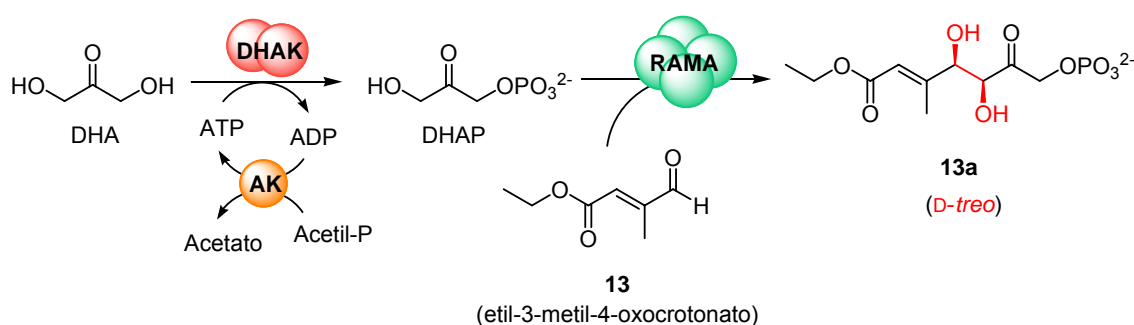
aquellos cuyo rendimiento en alguna de las estrategias utilizadas superó el 50% (aldehídos **2**, **4**, **5**, **7**, **8**, **9**, **12** y **13**), y tenían como objetivo la purificación e identificación de los aldoles generados con el sistema DHAK/RAMA, para verificar fehacientemente su aplicabilidad sintética. Para estas reacciones se eligió la estrategia en dos pasos puesto que, no solo permitía obtener todos los aldoles con la máxima acumulación final, sino que su aplicación práctica es más sencilla, permitiendo realizar conjuntamente el primer paso de todas las reacciones programadas para dividirlo posteriormente en varios segundos pasos independientes para cada aldehído (ver Materiales y Métodos). Los rendimientos obtenidos para la formación de aldol fueron muy similares a los previamente conseguidos en las reacciones a menor escala (Tabla 9R). La purificación se realizó mediante precipitación por sales de  $\text{Ba}^{2+}$  con un aceptable grado de pureza, que permitió la identificación de los productos mediante experimentos 1D y 2D de RMN (ver Materiales y Métodos).

De los resultados presentados podemos concluir que el sistema multienzimático acoplado para la síntesis de enlaces C-C objeto de estudio en esta Tesis es un método robusto y de amplia aplicabilidad. No sólo es aplicable con diferentes aldolasas dependientes de DHAP y aldehídos de gran diversidad estructural, sino que la adaptación del sistema a las estrategias en uno o dos pasos le confiere una gran flexibilidad. Gracias a ello es posible su utilización bajo diversas condiciones de reacción, como por ejemplo el uso de co-disolventes o de aldehídos que interfieran con la actividad quinasa.

## **Aldehídos $\alpha,\beta$ -insaturados como sustratos de RAMA en el contexto del sistema multienzimático**

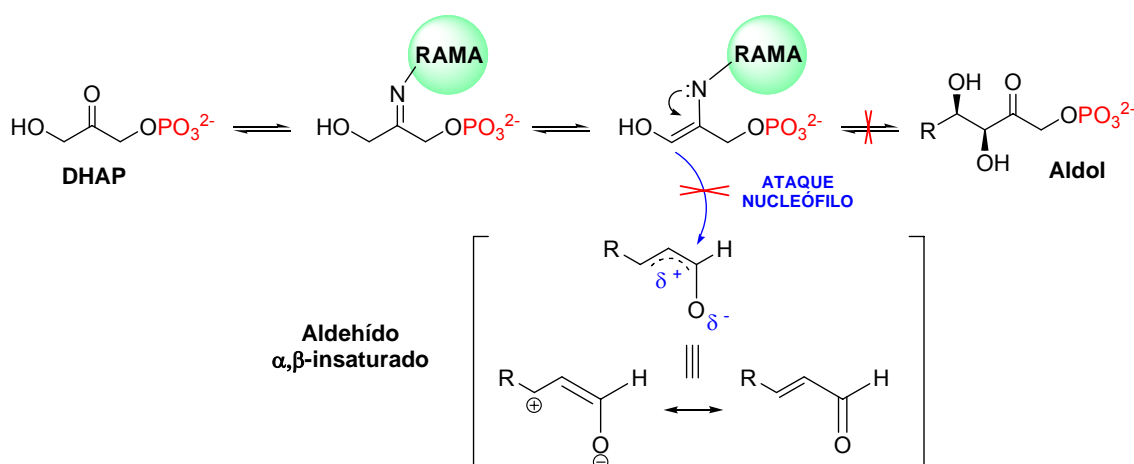
Sin duda, el resultado más sorprendente de los obtenidos durante el estudio de aplicabilidad sintética del sistema multienzimático fue la constatación de que, en el contexto de este sistema multienzimático, RAMA es capaz de catalizar la adición aldólica entre DHAP y el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado etil-3-metil-4-oxocrotonato (**13**) (Figura 47R). La única de las aldolasas dependientes de

DHAP comercialmente accesible es RAMA, con lo cual es una de las más estudiadas en cuanto a su aplicación sintética. En 1989, el grupo del Prof. Whitesides publicó el estudio más completo de los existentes sobre la aplicación sintética de RAMA (Bednarski *et al.*, 1989). En este trabajo se determinó que los aldehídos que tienen la insaturación conjugada con el grupo carbonilo no son aceptados como sustratos de RAMA.



**Figura 47R.** Sistema multienzimático para la reacción aldólica entre DHAP y el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado etil-3-metil-4-oxocrotonato, catalizada por RAMA.

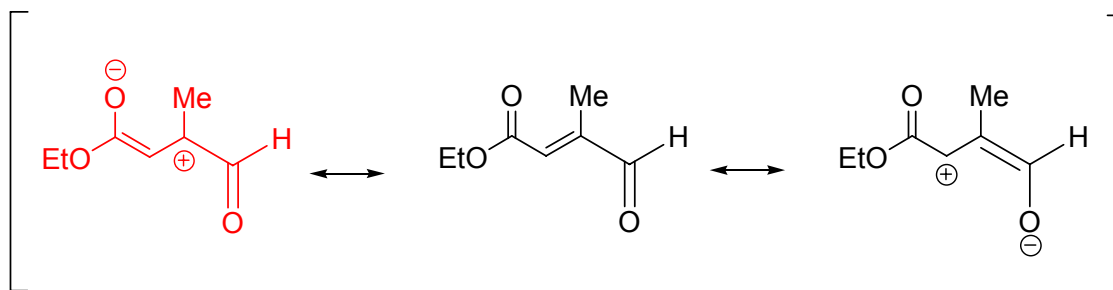
Este hecho se ve apoyado por las características químicas generales de esta familia de aldehídos, pues la conjugación del doble enlace con el carbonilo impide el ataque nucleófilo que tiene lugar en la adición aldólica con la DHAP (Figura 48R).



**Figura 48R.** Mecanismo de reacción de RAMA (aldolasa de clase I) y su incompatibilidad con la utilización de aldehídos  $\alpha,\beta$ -insaturados como sustratos.

Dicho de otro modo, los aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturados presentan reducida la densidad electrónica positiva en el carbono 1 ó carbono carbonílico, dado que se deslocaliza a través del doble enlace, por tanto, reduce su electrofilia en el ataque del nucleófilo que tiene lugar en la adición aldólica (o adición de tipo 1,2), siendo más propenso a reacciones tipo Michael (adiciones de tipo 1,4). Además, RAMA es una aldolasa de clase I, por lo que su mecanismo catalítico no requiere  $\text{Zn}^{2+}$  u otro metal divalente como cofactor que pudiese proporcionar al aldehído la electrofilia suficiente para que se produzca la adición aldólica, como sucede con otras aldolasas de clase II como la Fuc-1PA y Rha-1PA de *E. coli*.

A pesar de estos precedentes, en el presente trabajo se demuestra que al menos un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado si es sustrato de RAMA, que es capaz de catalizar la adición aldólica entre el etil-3-metil-4-oxocrotonato (**13**) y la DHAP (Figura 47R). En este caso, el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado **13** posee un grupo éster unido al doble enlace, por lo que adicionalmente tendrá una forma resonante con una carga negativa en el carbonilo del éster y una carga positiva en posición alfa del carbonilo del aldehído, lo cual hace más electropositivo a este carbonilo compensando la perdida de densidad de carga producida por la instauración (Figura 49R). En definitiva, la introducción del grupo atractor de electrones éster, conjugado con el doble enlace, debe activar al carbonilo de aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado. Un efecto que está de acuerdo con la observación general de Bednarski *et al.*, (1989) en la que los grupos electrón atrayentes activan al grupo carbonilo frente al ataque nucleófilo aumentando, por tanto, su reactividad.

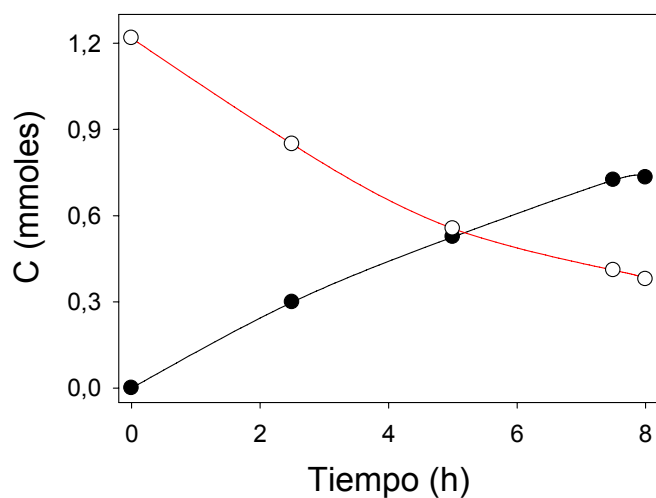


**Figura 49R.** Formas resonantes del aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado etil-3-metil-4-oxocrotonato (**13**). En rojo se indica la forma resonante que aumenta la electrofilia en el carbono carbonílico del aldehído, posibilitando la adición aldólica.

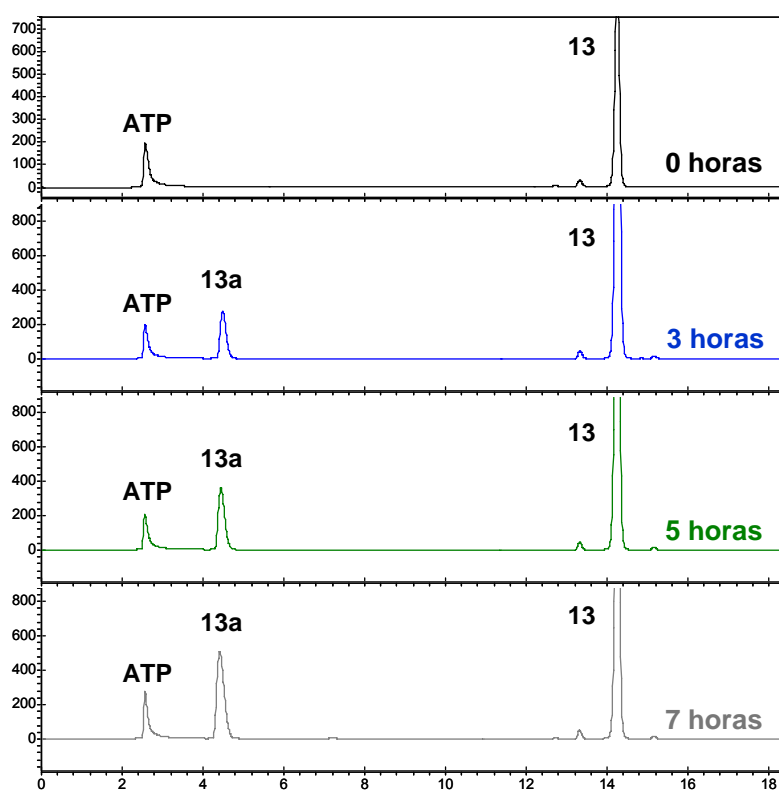
El aldol **13a** se sintetizó varias veces empleando el sistema multienzimático DHAK/RAMA, siguiendo siempre una estrategia en dos pasos, y en reacciones con escalas de sustrato de entre 0,3 mmoles y 3 mmoles con respecto a la DHAP inicial. En todos los casos se obtuvieron rendimientos de acumulación de aldol de entre el 50% y el 60%, con tiempos de reacción de entre 8 y 20 horas.

Uno de los factores que sin duda limitan el rendimiento de formación del aldol **13a** es la inestabilidad que presenta RAMA en el medio de reacción, mucho mayor que con el resto de aldehídos ensayados con el sistema, pues comienza a precipitar en poco tiempo de añadirla. La razón de esta inestabilidad puede atribuirse a la presencia del aldehído **13** que desnaturaliza poco a poco las proteínas del medio de reacción, tal y como se demostró en los ensayos previamente realizados con la estrategia en un solo paso, donde el sistema de fosforilación no funcionó apenas por interferencia con las enzimas DHAK y/o AK (Tabla 9R). Por esta razón fue necesario incrementar la cantidad inicial de RAMA, así como adicionar más enzima durante el transcurso de la reacción. El mayor rendimiento en la formación del aldol, el 60%, se alcanzó en reacciones a escala de 1,2 mmoles con respecto al sustrato DHAP, con una cantidad inicial de RAMA de 300 U y dos adiciones de 120 U más transcurridas 2,5 y 5 horas de reacción, en un tiempo total de 8 horas (Figura 50R). Estas condiciones se consideraron óptimas para la obtención de la mayor cantidad posible de aldol **13a**, aunque los rendimientos podrían incrementarse prolongando la vida útil de la aldolasa en el medio de reacción, utilizando diferentes estrategias como por ejemplo la inmovilización de la enzima o su adición gradual de forma controlada.

La formación del aldol **13a** en las reacciones se monitorizó mediante dos técnicas en paralelo: (i) valoración espectrofotométrica con ensayo enzimático acoplado, y (ii) detección por HPLC, donde el pico correspondiente al aldol **13a** fue identificado mediante ESI-MS (Figura 51R).



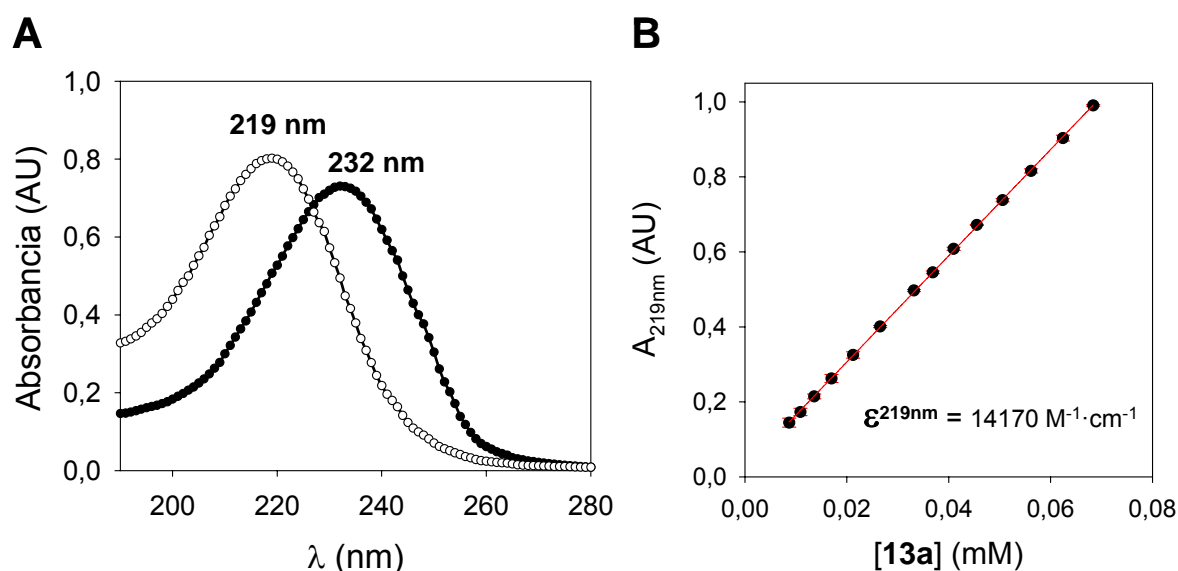
**Figura 50R.** Seguimiento de una reacción optimizada del sistema multienzimático DHAK/RAMA para la formación del aldol **13a**, con una estrategia en dos pasos. Se muestra la desaparición con el tiempo del sustrato DHAP (○) y la aparición del producto **13a** (●).



**Figura 51R.** Seguimiento mediante HPLC de una reacción del sistema DHAK/RAMA para la formación del aldol **13a** a partir del aldehído **13**, con una estrategia en dos pasos.

El desarrollo del método de HPLC utilizado para la detección del aldol **13a** posibilitó la purificación del compuesto a escala semipreparativa, con un grado

de pureza del 100%, mucho mayor al obtenido mediante purificación con sales de  $\text{Ba}^{2+}$ , logrando rendimientos de purificación que oscilaban entre el 80% y 90% con respecto al aldol acumulado en el tiempo final de la reacción (ver Materiales y Métodos). El compuesto purificado fue inequívocamente identificado mediante experimentos de 1D y 2D RMN, microanálisis y masas exactas (ver Materiales y Métodos). La caracterización fisico-química de **13a** se completó en primer lugar, con el estudio de su isomería óptica o estereoisomería, observándose un valor de  $[\alpha]_D^{25} = -1,67$  ( $C=0,9$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ). También se analizó el espectro de absorbancia en función de la longitud de onda ( $\lambda$ ) del compuesto **13a**, observándose un desplazamiento del máximo de absorbancia con respecto al aldehído **13** desde 232 nm hasta 219 nm (Figura 52R-A).



**Figura 52R. A.** Espectro de absorbancia comparativo entre el aldol **13a** (○) y el aldehído **13** (●) y sus máximos de absorbancia. **B.** Gráfica de absorbancia a 219 nm en función de la concentración de aldol **13a**, cuya pendiente es el coeficiente de extinción molar indicado.

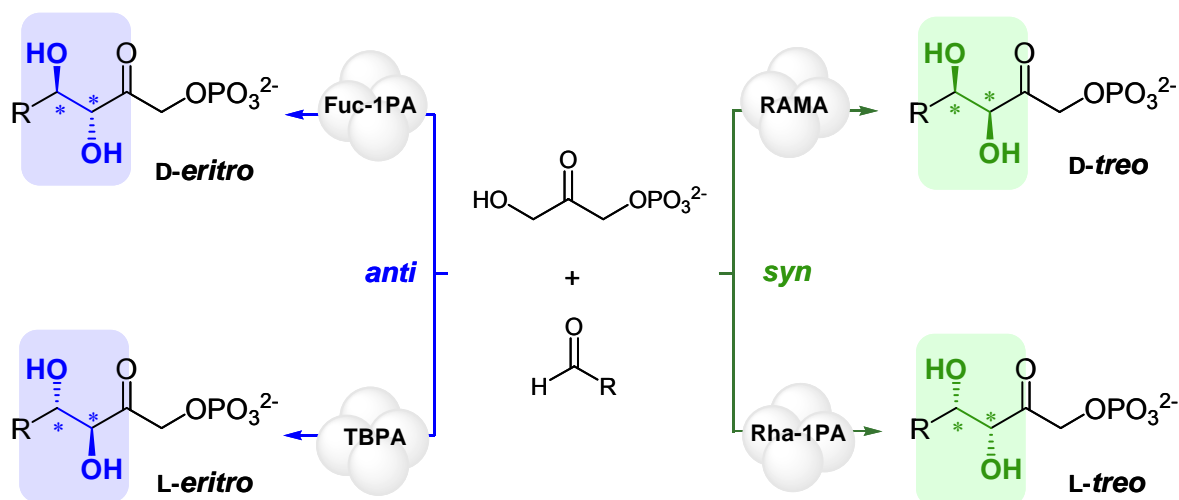
Durante la optimización de los protocolos de HPLC se utilizó el espectro obtenido con el aldehído **13** como referencia para la detección del aldol **13a** generado en las reacciones enzimáticas, en base al cual se fijó una  $\lambda$  para el detector cercana a 232 nm, el máximo del aldehído. Los datos obtenidos sobre el compuesto purificado explican por qué los cromatogramas de HPLC mostraban picos con una intensidad menor a la esperada para **13a**, mientras

que el aldehído **13** mantenía áreas considerablemente más altas. Simplemente, se eligió un máximo de detección demasiado alejado del máximo de absorbancia a 219 nm del aldol **13a**. Para una correcta cuantificación del producto **13a** tanto por HPLC como en disolución se realizó una recta patrón valorando la absorbancia a 219 nm en función de la concentración del aldol (Figura 52R-B). La pendiente de dicha recta corresponde a el coeficiente de extinción molar a 219 nm ( $\epsilon^{219\text{nm}}$ ) para el aldol **13a**, cuyo valor calculado fue  $14170 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

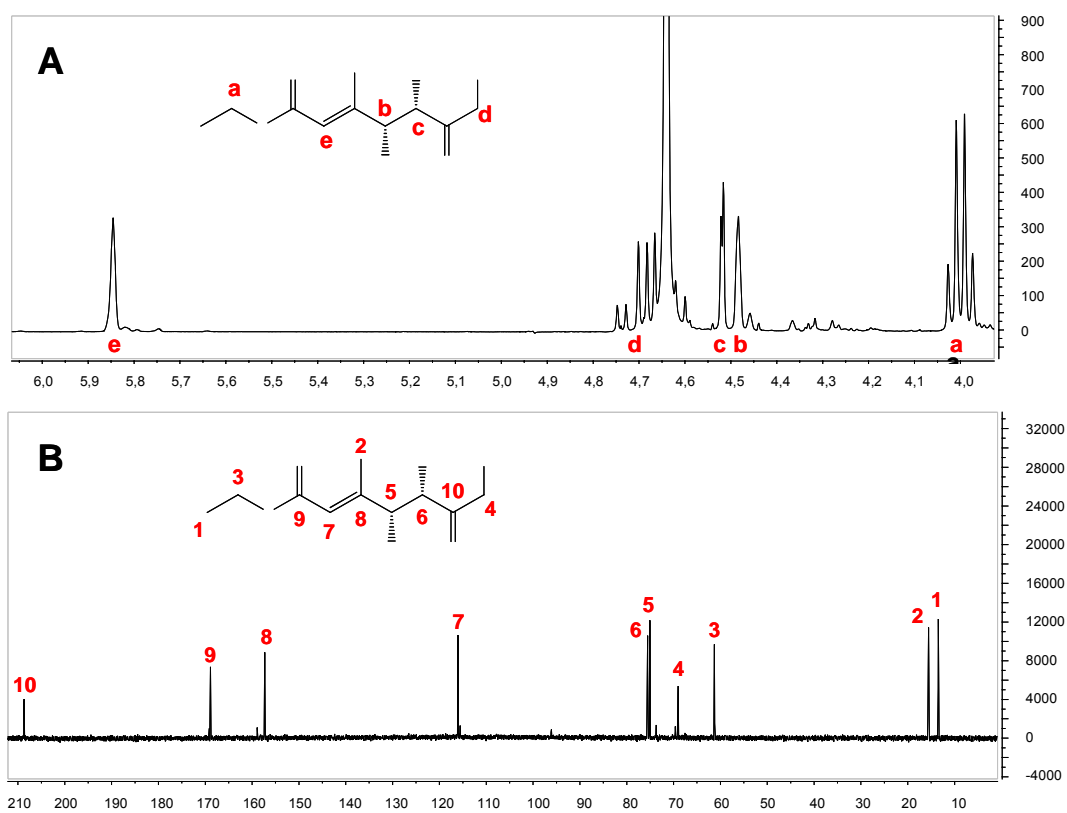
Como se explicó en la Introducción, las aldolasas dependientes de DHAP catalizan la adición aldólica con un alto control de la estereoquímica en los dos nuevos centros estereogénicos formados. No obstante, está descrito que las aldolasas dependientes de DHAP son altamente estereoselectivas en la posición C-3 del aldol (la que proviene de la DHAP en la reacción aldólica), mientras que la estereoselectividad de la posición C-4 (la que proviene del aldehído en la reacción aldólica) en ocasiones puede depender de la estructura y estereoquímica del aldehído utilizado, pudiéndose generar a una mezcla de diastereoisómeros (Schoevaart *et al.*, 2001; Espelt *et al.*, 2003; Espelt *et al.*, 2005). Puesto que hasta la fecha nunca se había descrito la adición aldólica catalizada por una aldolasa dependiente de DHAP con el etil-3-metil-4-oxocrotonato (**13**) como sustrato, y teniendo en cuenta que se trata de un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado, decidimos estudiar en profundidad la estereoquímica de esta reacción.

Es bien conocido que el estereoisómero mayoritario formado en adiciones aldólicas catalizadas por fructosa-1,6-bifosfato aldolasas es el *D-treo* (Figura 53R). Dado que en los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN se observa una única señal para el producto obtenido mediante el sistema multienzimático DHAK/RAMA (Figura 54R), se puede concluir que en el aldol purificado existe un único diastereoisómero, presumiblemente el correspondiente a la conformación *syn* de los dos hidroxilos situados en los nuevos centros estereogénicos (Figura 53R).



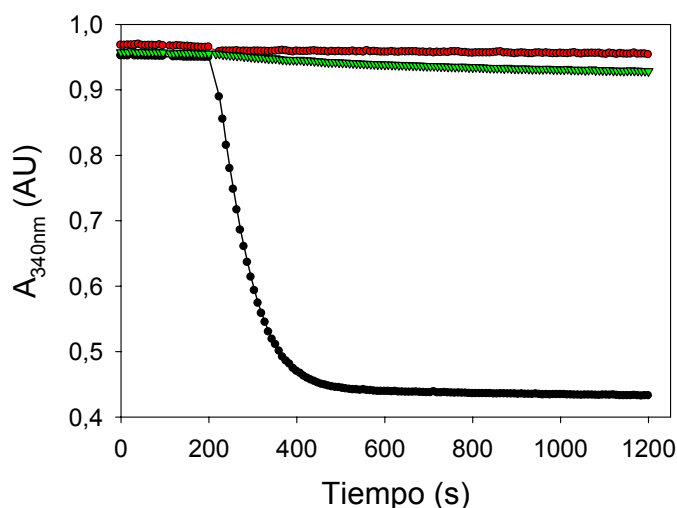


**Figura 53R.** Estereoquímica de las cuatro aldolasas dependientes de DHAP con los cuatro estereoisómeros posibles. Los diastereoisómeros *treo* (conformación *syn* de los hidroxilos) se muestran en verde mientras que los *eritro* (conformación *anti* de los hidroxilos) se muestran en azul, cada uno de ellos con sus dos formas enantioméricas D y L.



**Figura 54R.** Espectros <sup>1</sup>H (A) y <sup>13</sup>C (B) RMN obtenidos para el aldol 13a. En cada espectro se muestra la asignación de señales a los hidrógenos (a-d) y carbonos (1-10) correspondientes.

No obstante, la técnica de RMN no permite distinguir en este caso entre las dos formas enantioméricas del diastereoisómero, por lo que para determinar si existe un solo estereoisómero o una mezcla de enantiómeros se usó el análisis enzimático con diferentes aldolasas DHAP-dependientes, basado en la reversibilidad de la reacción aldólica (Schoevaart *et al.*, 2000). Para ello se sometió al aldol purificado del sistema DHAK/RAMA a tres ensayos de reacción retro-aldólica catalizada por las aldolasas RAMA, Fuc-1PA y Rha-1PA (Figura 55R). No se pudo realizar un cuarto ensayo con TBPA puesto que no disponíamos de la enzima. De los resultados de los ensayos se deduce que el aldol purificado es mayoritariamente sustrato de RAMA, confirmando que se trata del enantiómero D-*treo* (Tabla 10R). En el ensayo realizado con Rha-1PA existe una ligera pendiente que puede indicar la presencia minoritaria de la forma L-*treo*, estimada en un 4 % en función de la relación de pendientes con la retro-aldólica catalizada por RAMA. Por otra parte, no fue posible detectar ninguna actividad cuando la reacción retroaldólica se llevó a cabo con la Fuc-1PA. Como la suma de los enantiómeros D- y L-*treo* corresponde al total del aldol purificado, queda descartada también la presencia del enantiómero L-*eritro*. Por lo tanto, se puede concluir que el aldol **13a** corresponde mayoritariamente al enantiómero D-*treo*, con configuración absoluta (3*S*, 4*R*).



**Figura 55R.** Determinación enzimática de los estereoisómeros presentes en el aldol obtenido y purificado a partir del sistema multienzimático DHAK/RAMA. La caída de absorbancia a 340nm es proporcional al nivel de reacción en sentido retro-aldólica, catalizada por las aldolasas RAMA (●), Fuc-1PA (●) y Rha-1PA (▼).

**Tabla 10R.** Porcentaje de estereoisómeros detectados enzimáticamente en el producto **13a**, sintetizado con el sistema multienzimático DHAK/RAMA.

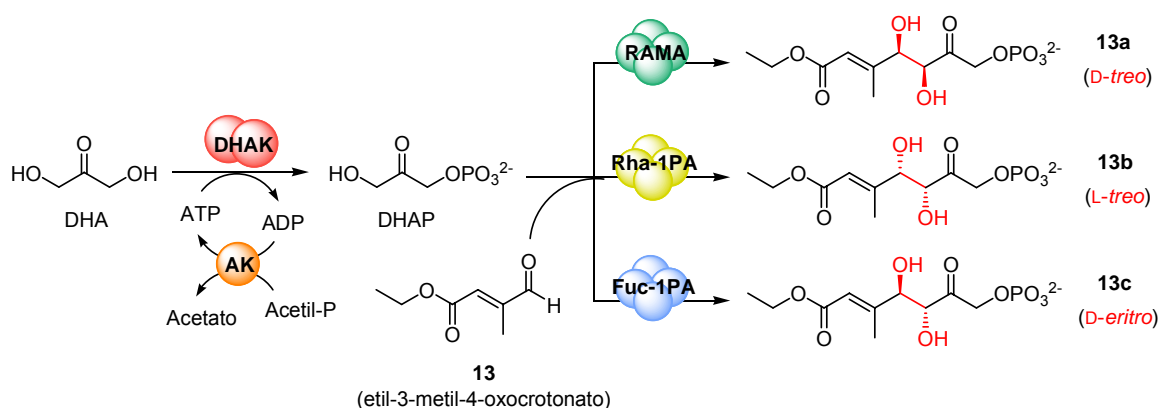
Aldol	Estereoisómero (%) <sup>[a]</sup>		
	D- <i>treo</i>	L- <i>treo</i>	D- <i>eritro</i>
<b>13a</b>	95,9	4,1	0,0

[a] El diastereoisómero con configuraciones L-eritro (correspondiente a la TBPA) no pudo ser detectado directamente con el ensayo enzimático. Los porcentajes fueron calculados con respecto al total de aldol utilizado en el ensayo enzimático.

## Síntesis de aldoles enantiocomplementarios a **13a** empleando el sistema multienzimático

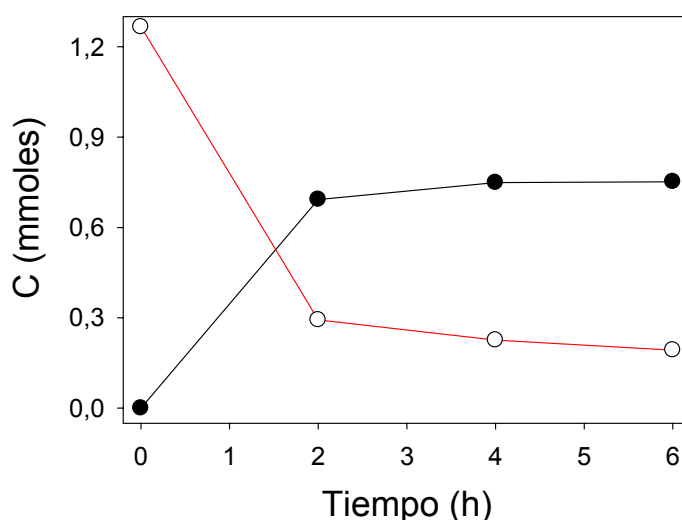
El aldol **13a** es un compuesto muy interesante pues posee diferentes funcionalidades que hacen de esta molécula un buen punto de partida en síntesis orgánica para la formación de nuevas estructuras. Por esta razón, es muy atrayente la posibilidad de obtener enantiómeros complementarios a **13a** (configuración D-*treo*) con el fin de ampliar la aplicabilidad del aldol en síntesis asimétrica de moléculas más complejas.

En los estudios de aplicabilidad sintética previamente realizados con los sistemas DHAK/Fuc-1PA y DHAK/Rha-1PA (Iturrate, 2008), se observó que el aldehído etil-3-metil-4-oxocrotonato (**13**) es sustrato de ambas aldolasas en el contexto del sistema multienzimático. Sin embargo, en el transcurso del mencionado trabajo el aldol resultante no se purificó ni caracterizó, por lo que no existen datos acerca de su estructura y estereoquímica. Por esta razón decidimos sintetizar y purificar los aldoles correspondientes a las aldolasas Fuc-1PA y Rha-1PA usando el aldehído **13** como sustrato (Figura 56R).



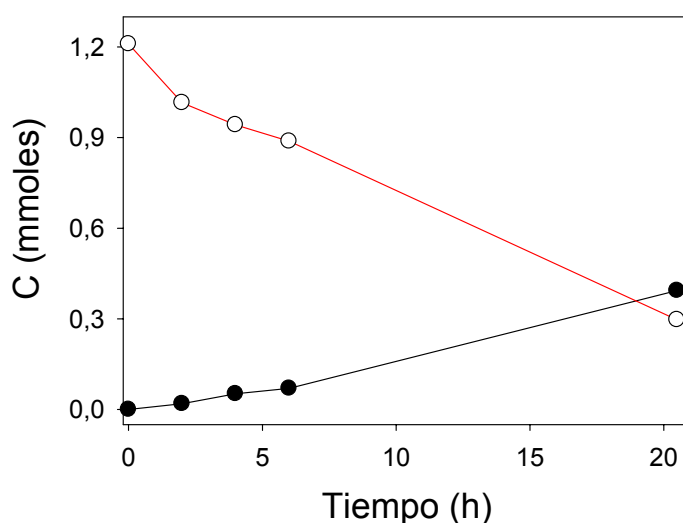
**Figura 56R.** Sistema multienzimático para la reacción aldólica entre DHAP y el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado etil-3-metil-4-oxocrotonato, catalizada por RAMA, Rha-1PA y Fuc-1PA.

Para la síntesis de los aldóles **13b** y **13c** se utilizaron condiciones de reacción similares a las previamente establecidas para la síntesis de **13a**, empleando la estrategia en dos pasos, y con reacciones a escala de 1 mmol con respecto al sustrato DHAP. Al igual que sucedió con RAMA, las aldolasas Fuc-1PA y Rha-1PA también se mostraron inestables en el medio de reacción en presencia del aldehído **13**, observándose abundante precipitación de proteína tras su adición. Para paliar la pérdida de enzima durante la reacción se siguió una estrategia similar a la usada en el sistema DHAK/RAMA: se incrementó la cantidad inicial de aldolasa y se adicionó más enzima durante el transcurso de la reacción. Para el sistema DHAK/Rha-1PA el mayor rendimiento alcanzado fue del 60 % tras 6 horas de reacción y se requirió una cantidad inicial de aldolasa de 42 U, añadiéndose 30 U más transcurridas 3 horas. Esta reacción avanzó muy rápido las primeras dos horas, pero luego se ralentizó y apenas progresó a pesar de la adición de mas enzima (Figura 57R). No obstante, el rendimiento final alcanzado demuestra que esta aldolasa es más eficiente en la catálisis de la adición aldólica entre DHAP y el aldehído **13** que RAMA, pues el número total de unidades de Rha-1PA empleadas es considerablemente menor: 72 U frente a 540 U de RAMA.



**Figura 57R.** Seguimiento de una reacción optimizada del sistema multienzimático DHAK/Rha-1PA para la formación del aldol **13b**, con una estrategia en dos pasos. Se muestra la desaparición con el tiempo del sustrato DHAP (○) y la aparición del producto **13b** (●).

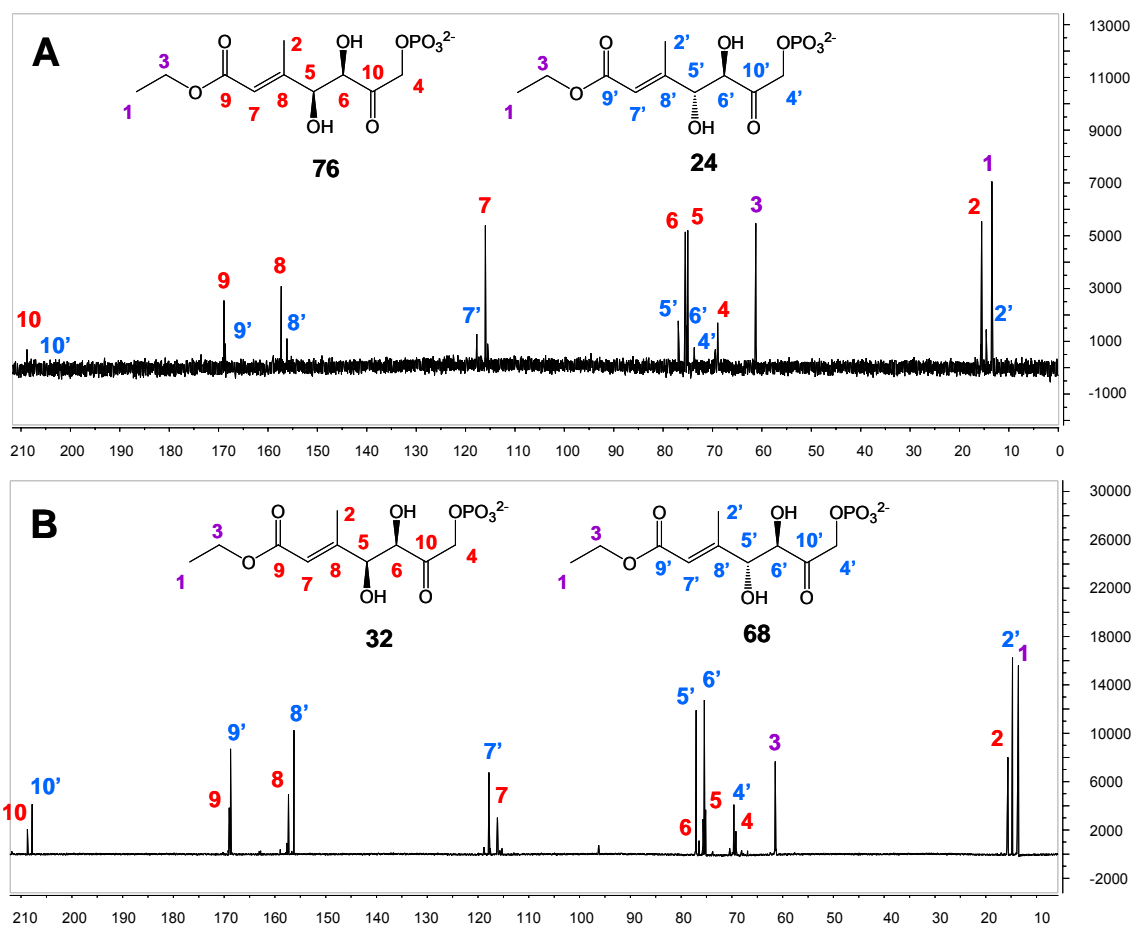
En cuanto a la síntesis del aldol **13c**, las reacciones ensayadas con el sistema multienzimático acoplado a Fuc-1PA alcanzaron rendimientos menores a los obtenidos previamente con RAMA y Rha-1PA. El máximo rendimiento logrado fue del 33% tras más de 20 horas de reacción, utilizando una cantidad inicial de Fuc-1PA de 110 U, y adicionando 40 U más transcurridas 6 horas. A diferencia de la reacción catalizada por Rha-1PA, en esta ocasión la formación de producto es constante aunque mucho más lenta, a pesar de realizarse con mayor número de unidades enzimáticas (Figura 58R). Este hecho muestra que el aldehído **13** es peor sustrato de Fuc-1PA que de Rha-1PA, aunque podría considerarse más eficiente que RAMA en la catálisis de la adición aldólica de este aldehído, puesto que la relación de actividades totales usadas es considerablemente menor en la reacción con Fuc-1PA: el empleo de una cantidad de enzima 3,5 veces menor permitió obtener la mitad del rendimiento logrado con RAMA. Por lo tanto, esta reacción es susceptible de mejorar sustancialmente su rendimiento incrementando las unidades totales de Fuc-1PA y espaciando su adición a lo largo de la reacción.



**Figura 58R.** Seguimiento de una reacción optimizada del sistema multienzimático DHAK/Fuc-1PA para la formación del aldol **13c**, con una estrategia en dos pasos. Se muestra la desaparición con el tiempo del sustrato DHAP (○) y la aparición del producto **13c** (●).

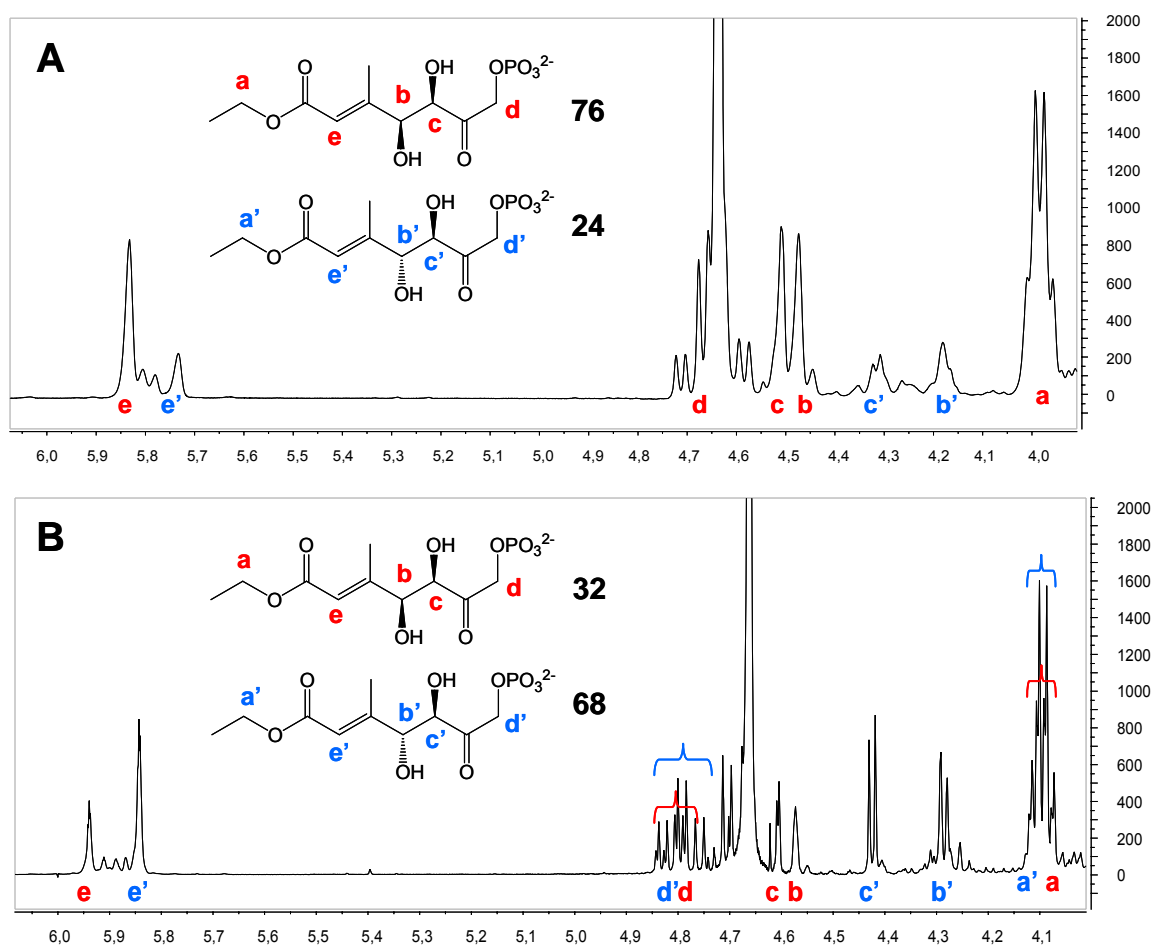
La purificación de los aldoles resultantes de las reacciones con los sistemas DHAK/Rha-1PA y DHAK/Fuc-1PA se realizó de forma similar a la del aldol **13a** mediante HPLC a escala semipreparativa (ver Materiales y Métodos), aunque los rendimientos de purificación resultaron menores: 30% para **13b** y 50% para **13c** con respecto al aldol acumulado en el medio al final de la reacción. Este menor rendimiento puede deberse a la interferencia producida por la mayor concentración de proteína presente en el medio final, ya que tanto Rha-1PA como Fuc-1PA se añadieron en mayor cantidad que RAMA puesto que muestran una actividad específica considerablemente menor, siendo necesaria más proteína para igual número de unidades enzimáticas. Antes de la purificación por HPLC se realizó un tratamiento del medio para precipitar y filtrar la mayor cantidad de proteína posible, aunque el proceso debe optimizarse a la vista del resultado final del proceso de purificación.

Una vez purificados, los aldoles **13b** y **13c** fueron identificados mediante masas exactas y experimentos de 1D y 2D RMN (ver Materiales y Métodos). En los espectros de  $^{13}\text{C}$  (Figura 59R) y  $^1\text{H}$  (Figura 60R) RMN de los compuestos se observa que las señales correspondientes a los aldoles purificados están desdobladas, indicando la presencia de una mezcla de dos diastereoisómeros.



**Figura 59R.** Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN obtenidos para los aldoles **13b** (A) y **13c** (B). En cada espectro se muestra la asignación de señales a los carbonos de los diastereoisómeros *treo* (2-10), *eritro* (2'-10') y los comunes a ambos (1-3), cuya estructura y proporción se muestra en el inserto. La proporción de cada diastereoisómero fue cuantificada en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

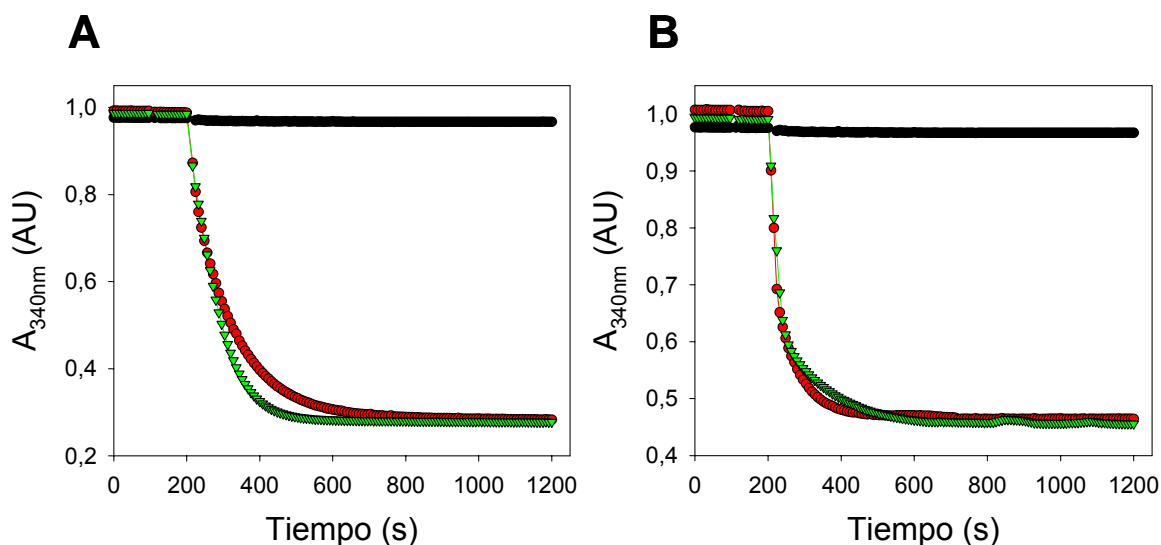
Una de las señales coincide con la previamente identificada para el aldol **13a**, lo cual permitió asignarla al diastereoisómero *treo* mientras que las nuevas señales corresponden al diastereoisómero *eritro*. Es interesante observar que para el producto purificado de la reacción catalizada por Rha-1PA la proporción entre los diastereoisómeros *treo* y *eritro* es de 76/24, siendo mayoritaria la forma descrita como específica para esta aldolasa (Figura 53R). Por el contrario la relación de diastereoisómeros *treo/eritro* se invierte en el producto obtenido con la Fuc-1PA que se determinó en 32/68 mediante RMN, siendo mayoritaria la forma *eritro* específica para esta aldolasa.



**Figura 60R.** Espectros  $^1\text{H}$  RMN obtenidos para los aldoles **13b** (A) y **13c** (B). En cada espectro se muestra la asignación de señales a los hidrógenos de los diastereoisómeros *treo* (a-e) y *eritro* (a'-e'), cuya estructura y proporción se muestra en el inserto.

Para un estudio más detallado de la estereoselectividad de Rha-1PA y Fuc-1PA con respecto al aldehído **13** se sometieron a los aldoles purificados a tres ensayos de reacción retro-aldólica catalizada por las aldolasas RAMA, Fuc-1PA y Rha-1PA, tal y como se hizo con el aldol **13a** (Figura 61R). Los resultados obtenidos son coherentes con lo previamente observado mediante RMN, pues en los dos aldoles purificados se observa reacción retro-aldólica con las aldolasas Rha-1PA y Fuc-1PA, lo cual indica que en ambos casos existe una mezcla de enantiómeros *L-treo* y *D-eritro* (Tabla 11R).





**Figura 61R.** Determinación enzimática de los estereoisómeros presentes en los aldoles obtenidos a partir de sistema multienzimático DHAK/Rha-1PA (**A**) y DHAK/Fuc-1PA (**B**). La variación de absorbancia a 340nm con el tiempo es proporcional al nivel de reacción en sentido retro-aldólica, catalizada por las aldolasas RAMA (●), Fuc-1PA (●) y Rha-1PA (▼).

**Tabla 11R.** Porcentaje de estereoisómeros detectados enzimáticamente en los productos **13b** y **13c** sintetizados con el sistema multienzimático DHAK/Aldolasa.

Aldol	Estereoisómero (%) <sup>[a]</sup>		
	D- <i>treo</i>	L- <i>treo</i>	D- <i>eritro</i>
<b>13b</b>	0,0	50,0	50,0
<b>13c</b>	0,0	50,0	50,0

[a] El diastereoisómero con configuraciones L-eritro (correspondiente a la TBPA) no pudo ser detectado directamente con el ensayo enzimático. Los porcentajes fueron calculados con respecto al total de aldol utilizado en el ensayo enzimático.

La presencia del enantiómero D-*treo* queda descartada puesto que en ninguno de los casos se observa retro-aldólica en el ensayo con RAMA, mientras que la ausencia del enantiómero L-*eritro* se verificó indirectamente puesto que la suma total de los otros tres aldoles valorados corresponde al total de producto utilizado en el ensayo. No obstante, los resultados obtenidos en este ensayo enzimático en cuanto a porcentaje de cada diastereoisómero son

ligeramente diferentes a los obtenidos mediante RMN, indicando la presencia del 50% de cada uno de ellos, frente al aproximadamente 70/30 determinado por resonancia. Esta diferencia puede deberse a la mayor sensibilidad que posee la técnica de RMN, por lo que tomaremos como válidos los resultados obtenidos mediante resonancia.

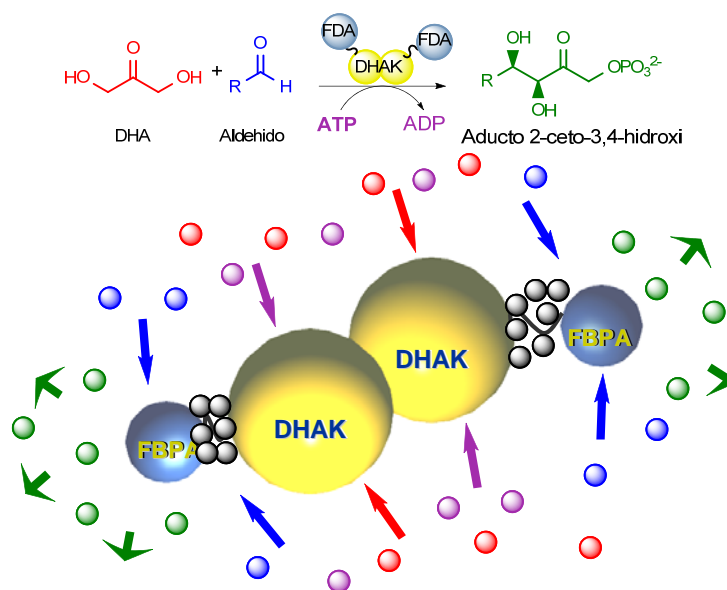
Con los datos recopilados se puede concluir que los aldoles obtenidos mediante reacción aldólica con Rha-1PA y Fuc-1PA son en realidad una mezcla de diastereoisómeros, compuesta por los estereoisómeros *L-treo* (3*R*,4*S*) y *D-eritro* (3*R*,4*R*). El producto mayoritario es siempre el específico para la correspondiente aldolasa; es decir: *L-treo* para Rha-1PA y *D-eritro* para Fuc-1PA, con un porcentaje de 75% y 68% respectivamente. Por lo tanto, el control de la estereoquímica de las adiciones aldólicas catalizadas por Rha-1PA y Fuc-1PA cuando se utiliza como sustrato el aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado etil-3-metil-4-oxocrotonato es menor que el control ejercido por RAMA.

## **Modificación de la especificidad hacia el donador de fosfato mediante evolución dirigida de la DHAK**

A pesar de la probada capacidad sintética del sistema multienzimático DHAK/Aldolasa para la formación de enlaces C-C, todavía existen aspectos susceptibles de optimizar.

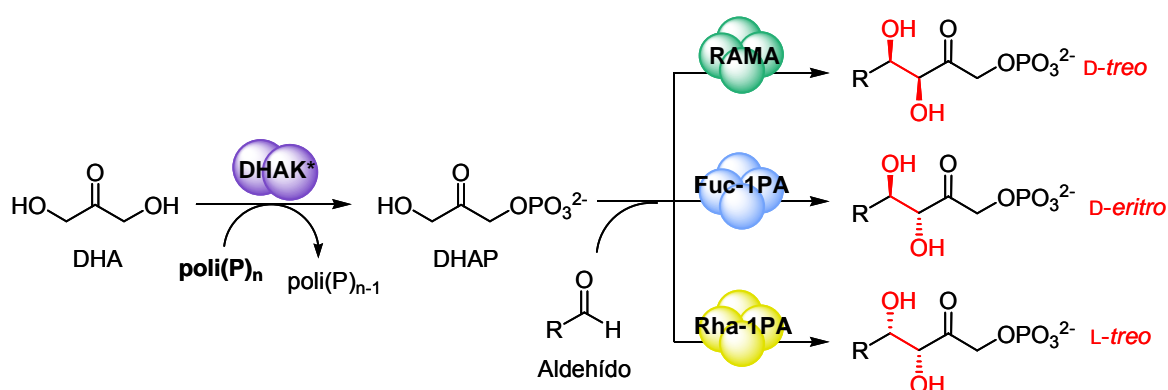
Un punto clave es el número de enzimas que intervienen en el proceso porque, aunque su producción en organismos recombinantes es relativamente fácil, la purificación de proteínas sigue siendo tecnológica y económicamente uno de los cuellos de botella en el desarrollo de un proceso biocatalítico (Asenjo y Andrews, 2008). En este sentido hemos diseñado y obtenido un enzima bifuncional aldolasa-quinasa que presenta, dentro de la misma cadena polipeptídica, las funciones quinasa y aldolasa unidas por un brazo espaciador (Figura 62R). Desde el punto de vista biotecnológico, este enzima bifuncional presenta dos ventajas fundamentales frente a la utilización de los enzimas independientes: por un lado, supone un abaratamiento de la purificación ya que

las dos actividades se encuentran en una única cadena polipeptídica; por otro lado, la proximidad que impone la fusión entre los centros activos que catalizan reacciones secuenciales supone un aumento en la velocidad de la reacción global de 20 veces que se puede interpretar en términos de *canalización del sustrato* (Iturrate *et al.*, 2009). El trabajo realizado para la obtención y caracterización de la enzima bifuncional formó parte de la Tesis de la Dra. Laura Iturrate (Iturrate, 2008) por lo que no es objeto de esta memoria.



**Figura 62R.** Enzima bifuncional aldolasa/quinasa. Esta enzima permite la síntesis de aldoles empleando DHA como donador inicial con un aumento en la velocidad de reacción de 20 veces con respecto a los enzimas parentales libres.

El otro aspecto susceptible de optimización es la necesidad de emplear un sistema de regeneración de ATP. Este aspecto lo hemos abordado en esta Tesis Doctoral, mediante un programa de Evolución Dirigida de la DHAK, diseñado para modificar su especificidad por el donador de fosfato desde ATP hacia poli-fosfato inorgánico (poli- $P_i$ ) (Figura 63R).

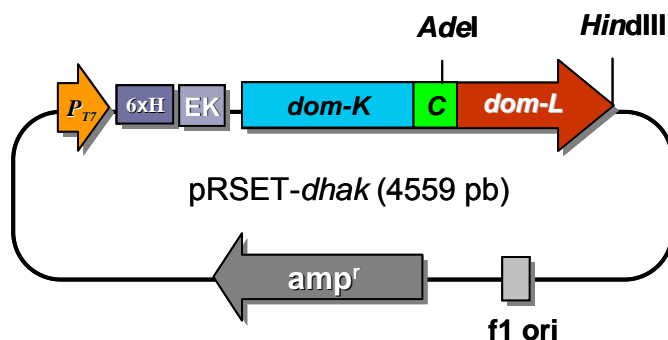


**Figura 63R.** Sistema multienzimático mejorado mediante Evolución Dirigida de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.

El poli-P<sub>i</sub> es una molécula polimérica formada por entre 12 y 13 moléculas de fosfato unidos mediante enlaces fosfodiéster de alta energía, que es utilizado como sustrato donador por las poli-fosfato quinazas, y que no produce inhibición en fosfotransferasas (Haeusler *et al.*, 1992). Por lo tanto, una nueva DHAK evolucionada haría innecesaria la regeneración del donador de fosfato, por lo que se podría prescindir de la AK, simplificando así el sistema. Además el bajo coste del poli-P<sub>i</sub>, unas 1000 veces más barato que el ATP, es un aliciente para una futura aplicación sintética a escala industrial del sistema multienzimático.

Como ya se explicó durante la Introducción, la Evolución Dirigida o evolución *in vitro*, es una técnica que permite mimetizar la evolución natural en una escala temporal de laboratorio. Esto quiere decir que cada paso realizado mediante Evolución Dirigida implica la generación de heterogeneidad genética en una población mediante mutaciones producidas al azar, la recombinación de las mutaciones generadas para incrementar la variabilidad, y por último la selección de aquellos individuos mejor adaptados por la adquisición de una nueva característica. De la misma forma que para la evolución Darwiniana, el paso clave para la Evolución Dirigida está en la imposición de una presión selectiva bajo la que prevalezcan las mutaciones beneficiosas frente a las perjudiciales o deletéreas, pero difiere en que esta presión está impuesta por el investigador y la selección no es natural, sino determinada por las características que se desean obtener o mejorar en una determinada proteína (Valetti y Gilardi, 2004).

Como se ha demostrado en varios trabajos, esta técnica resulta más eficaz que los denominados métodos racionales a la hora de obtener mutaciones beneficiosas debido al escaso conocimiento actual de la relación estructura-función (Antikainen y Martin, 2005; Gerlt y Babbitt, 2009). Así, una de las principales ventajas de esta técnica es que no requiere un conocimiento previo de la estructura de la proteína a evolucionar, puesto que las nuevas mutaciones se generan al azar y posteriormente se seleccionan aquellas que han generado un fenotipo mejorado en una determinada característica (Valetti y Gilardi, 2004). No obstante, en el caso de la DHAK de *C. freundii*, el previo conocimiento de la estructura cristalográfica de la enzima presente en la cepa DMS 30040 (Siebold *et al.*, 2003a) nos permitió plantear una estrategia semi-racional de evolución *in cassette* para modificar únicamente el dominio-L donde se localiza en sitio de unión a ATP manteniendo inalterado el dominio de reconocimiento a DHA. La clave para el desarrollo de esta estrategia fue la localización de una única diana de restricción, específica para la enzima *Adel*, situada en la región génica codificante para los aminoácidos que conectan el dominio-K con el dominio-L (Figura 64R).

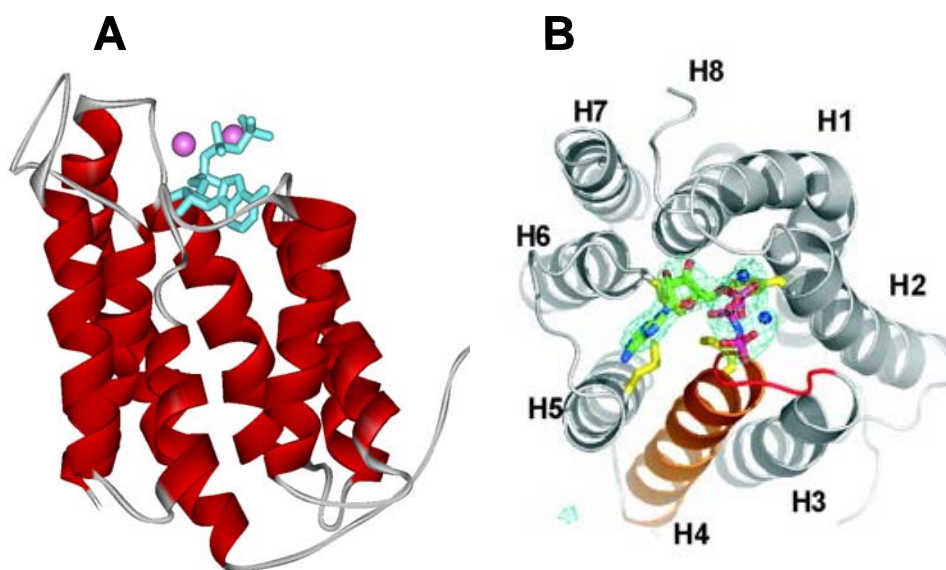


**Figura 64R.** Esquema de la construcción pRSET-dhak, donde se localiza el gen que codifica para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Los fragmentos génicos codificantes para los dominios-K y L se muestran en azul y rojo respectivamente, mientras que la secuencia conectora se muestra en verde. Se indican de las dianas de restricción para *Adel* y *HindIII*.

La diana de restricción específica posibilitó la escisión del fragmento codificante para el dominio-L del resto del gen *dhak* mediante digestión con las enzimas *Adel* y *HindII*, y posibilitó la posterior introducción de una colección de fragmentos con variabilidad genética inducida. Con la elección de una estrategia

semi-racional de evolución dirigida esperábamos disminuir considerablemente la aparición de mutantes de DHAK inefectivos, restringiendo el proceso de mutagénesis a una región específica de la proteína, en la cual se localiza la propiedad que es objeto de modificación (Chica *et al.*, 2005).

Además, el previo conocimiento de la estructura cristalina de la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 nos permitió predecir la posibilidad de que una molécula polimérica tan diferente del ATP como es el poli- $P_i$  fuera capaz de unirse al sitio específico situado en el dominio-L de la proteína. La estructura terciaria de la DHAK indica que la interacción entre ATP y la proteína no se produce en el interior de un bolsillo específico como sucede con otras quinasas, sino que tiene lugar de forma superficial, en lo alto del baril formado por ocho  $\alpha$ -hélices anfipáticas (Figura 65R).



**Figura 65R.** Estructura terciaria del dominio-L con el ATP (*sticks*) unido a su sitio específico, en coordinación con dos iones  $Mg^{2+}$  (*balls*). Se muestra una vista lateral (**A**) y otra desde arriba (**B**) del dominio donde se observa la interacción del ATP con las ocho  $\alpha$ -hélices que lo forman. La Figura **B** ha sido tomada de Siebold *et al.*, 2003a.

De esta forma quedaba abierta la posibilidad de que el poli- $P_i$  interaccionase también superficialmente con los residuos responsables de la interacción del trifosfato del ATP, posibilitando la transferencia de uno de sus fosfatos unidos mediante enlaces de alta energía.

No obstante, a pesar de lo prometedor de la estrategia semi-racional ateniéndonos a la estructura terciaria de la proteína, es importante destacar que durante la caracterización bioquímica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se observó una especificidad absoluta de la enzima hacia el ATP como donador de fosfato. La enzima no fue capaz de utilizar ningún nucleótido trifosfato como sustrato en las condiciones ensayadas, al igual que sucedió con el poli-P<sub>i</sub>. Este detalle es importante puesto que hasta hace relativamente poco tiempo se consideraba imposible generar una actividad *de novo* a partir de una proteína natural utilizando la evolución dirigida, con la única excepción de los anticuerpos catalíticos (Tao y Cornish, 2002). Por lo tanto, se realizó un nuevo ensayo de fosforilación de DHA con DHAK en presencia de poli-P<sub>i</sub> como donador, incrementando las cantidades de enzima y los tiempos de incubación. En estas condiciones se pudo observar una pequeñísima variación de la absorbancia a 340 nm, que podría indicar la presencia de una cierta actividad quinasa residual en presencia de poli-P<sub>i</sub>.

En los últimos años, coincidiendo con el desarrollo de las técnicas de evolución dirigida, se han descrito numerosos casos en los cuales se ha logrado generar una nueva actividad a partir de una enzima natural mediante ingeniería de proteínas, o bien incrementar el rango de especificidad de sustrato en enzimas inicialmente muy específicas para un determinado compuesto (Tracewell y Arnold, 2009). Además, la mayor comprensión del mecanismo evolutivo de las proteínas ha mostrado la importancia que tiene para este fenómeno la promiscuidad enzimática, puesto que las habilidades latentes de la enzima pueden desarrollarse mediante Evolución Dirigida, posibilitando la obtención de nuevas actividades o especificidades (Kazlauskas, 2005; Yoshikuni *et al.*, 2006).

### **Obtención de una genoteca de mutantes con variabilidad genética**

El primer paso en el proceso de Evolución Dirigida consistió en la generación de diversidad génica mediante mutagénesis al azar sobre el fragmento de ADN que codifica para el dominio-L de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Este

proceso de mutagénesis se realizó mediante PCR propensa a error (EP-PCR). Esta técnica se basa en el grado de error intrínseco que tiene determinadas DNA polimerasas, y que puede ser modulado introduciendo medios de reacción desbalanceados, análogos de nucleótidos fosfato o cambiando el catión divalente que actúa como cofactor de la enzima por  $Mn^{2+}$  (Rasila *et al.*, 2009). La técnica consiste en realizar una amplificación del fragmento génico a evolucionar mediante PCR en condiciones mutagénicas, cuyo control permite establecer el número y frecuencia de las mutaciones generadas durante el proceso. La técnica de evolución *in vitro* implica la realización de sucesivos ciclos de mutagénesis con baja tasa de mutación en cada uno de ellos para acumular poco a poco las mutaciones beneficiosas y que el efecto de éstas no quede enmascarado por el de las mutaciones deletéreas y perjudiciales (Valetti y Gilardi, 2004). Por esta razón se establecieron las condiciones de EP-PCR para obtener entre 1 y 4 mutaciones por cada 1000 pares de bases, que es el rango óptimo descrito en la bibliografía.

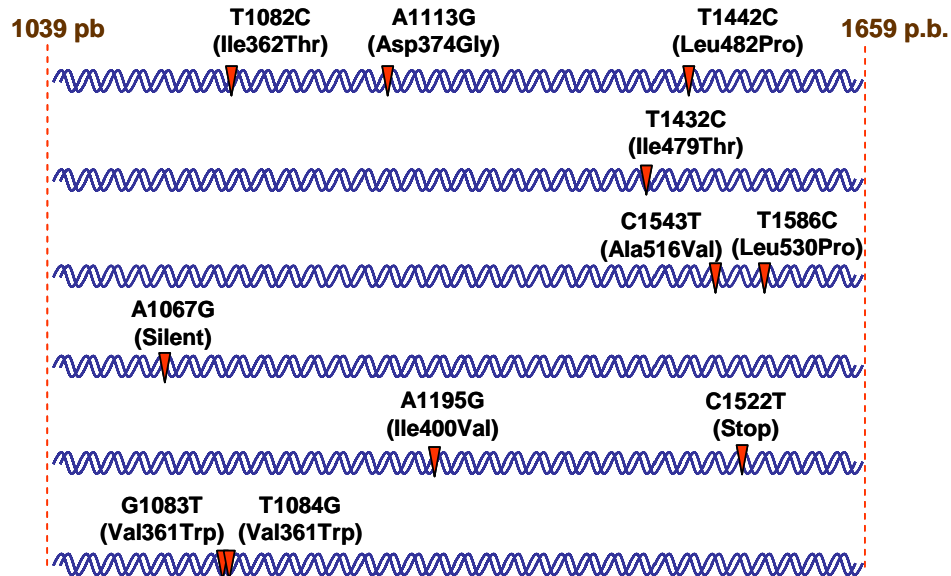
Se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación del fragmento del gen *dhak* que codifica para el dominio-L, incorporando dianas de restricción para los enzimas *Adel* y *HindIII*. A partir de la construcción pRSET-*dhak* se amplificaron mediante EP-PCR una colección de fragmentos génicos de 620 pb., que concuerda con el tamaño del ADN codificante para el dominio-L.

La heterogeneidad de la colección de fragmentos mutantes generada en el proceso de EP-PCR se examinó clonando una porción de los fragmentos génicos en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y transformándolos posteriormente en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*. Seis de las colonias obtenidas fueron seleccionadas al azar para la secuenciación del fragmento génico incorporado al plásmido. De los resultados obtenidos se desprende que la tasa de mutación lograda es de 2-3 mutaciones por fragmento génico, que está dentro del rango considerado como óptimo en la bibliografía de 1-4 mutaciones/1 kb (Figura 66R).

De los resultados también se desprende que el porcentaje de bases AT mutadas fue del 67% frente al 33% de bases GC. Esta desviación está dentro de lo esperado en la técnica de EP-PCR utilizando la *Taq* polimerasa pues está



descrito que en estas condiciones la enzima tiene una mayor tendencia mutacional hacia los pares AT frente a los pares GC (Rasila *et al.*, 2009).



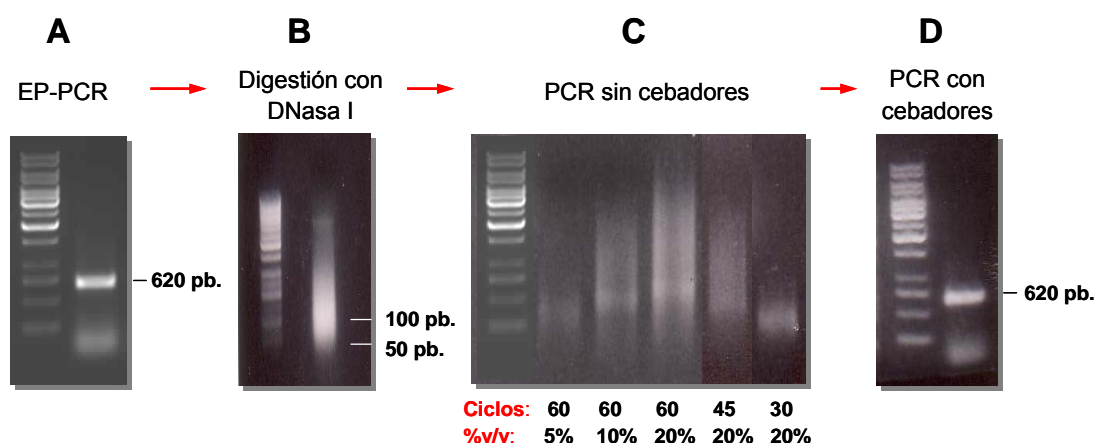
**Figura 66R.** Distribución de las mutaciones obtenidas mediante EP-PCR a lo largo del fragmento génico que codifica para el dominio-L. Para cada mutación se indica la alteración en la secuencia de ADN y en la secuencia aminoacídica total de la proteína (entre paréntesis).

Aparte de la mayor tendencia mutacional hacia GC es bien conocido que en la EP-PCR la distribución de las mutaciones obtenidas no es totalmente al azar puesto que la DNA polimerasa tiene una tendencia natural a la acumulación de mutaciones en regiones espacialmente próximas. Además, en las genotecas producidas mediante EP-PCR se acumulan conjuntamente tanto las mutaciones beneficiosas como las deletéreas o perjudiciales, lo cual es una importante limitación al proceso evolutivo debido a la baja probabilidad de que el efecto de las pocas mutaciones beneficiosas generadas prevalezca sobre las deletéreas, estadísticamente mucho más abundantes (Valetti y Gilardi, 2004). Así, la evolución *in vitro* realizada sólo mediante EP-PCR es equivalente a un proceso de evolución natural basado en la reproducción asexual.

La solución a este inconveniente se encuentra de nuevo en los procesos evolutivos naturales, puesto que los seres vivos con reproducción sexual incorporan un mecanismo que les permite aumentar su variabilidad genética y diluir el efecto de las mutaciones deletéreas: la recombinación de material

genético. Existen varios métodos de recombinación *in vitro* que pueden aplicarse al proceso de evolución dirigida para incrementar la variabilidad, entre los cuales hemos seleccionado la técnica denominada *DNA shuffling*. Esta técnica fue introducida en 1994 por el profesor Stemmer, y es uno de los métodos más empleados para la recombinación *in vitro* de fragmentos generados mediante EP-PCR (Stemmer, 1994a y b). Consiste en una digestión controlada de la genoteca de ADN parental para su posterior recombinación mediante una PCR sin cebadores, en la cual los propios fragmentos de ADN generados actúan a la vez como cebadores y como molde (Figura 67R).

La colección de fragmentos génicos mutantes obtenida mediante EP-PCR (Figura 67R-A) fue purificada y sometida a recombinación utilizando la técnica *DNA Shuffling*. En primer lugar se llevó a cabo una digestión controlada con DNasa I del producto (Figura 67R-B).



**Figura 67R.** Optimización de la técnica de Evolución Dirigida sobre el dominio-L de la DHAK de *C. freundii*. **A:** Obtención de una colección de mutantes por EP-PCR. **B:** Digestión de los fragmentos génicos con 0,14 U de DNasa I durante 5 min. a temperatura ambiente. **C:** Los fragmentos de entre 50-100 pb purificados se reordenaron al tamaño original mediante una PCR en ausencia de cebadores. Tanto al aumentar la cantidad de fragmentos utilizados (%v/v) como el número de ciclos de PCR (Ciclos), la reconstrucción del producto se aproxima a su tamaño original. **D:** Un único producto de PCR con el tamaño correcto se obtiene al llevar a cabo 40 ciclos de reacción adicionales en una PCR con cebadores.

La cantidad y tiempo de incubación del ADN con esta endonucleasa inespecífica es crucial, puesto que una exposición demasiado prolongada da

lugar a sobre-digestión y a la aparición de fragmentos demasiado pequeños para su uso en recombinación. El tamaño óptimo de los fragmentos digeridos debe ser de entre 50-100 pb., por lo que las condiciones de digestión con DNasa debieron optimizarse para lograr una representación heterogénea de fragmentos comprendidos en este rango de tamaños. Las condiciones fueron optimizadas mediante digestión de fragmentos génicos control, amplificados en condiciones no mutagénicas, y fueron establecidas en incubaciones de 5 minutos con 0,14 U de DNasa I (Figura 67R-B). Una vez digerida la colección de mutantes, el método elegido para la extracción del rango de fragmentos deseado del gel de agarosa fue la electroelución (Kurien y Scofield, 2002), ya que los métodos comerciales presentaban rendimientos bajos para fragmentos pequeños (< 75 pb se obtenían rendimientos del 3%). Siguiendo este protocolo se logró una purificación de fragmentos suficiente para proseguir con la técnica.

Posteriormente se realizó una PCR sin cebadores en la cual los fragmentos digeridos actúan tanto de ADN molde como de cebadores (Figura 67R-C). Se optimizaron las condiciones para que el tamaño medio de los productos de PCR fuese lo más próximo posible al original: aumentando el número de ciclos de reacción, la población media alcanzaba progresivamente tamaños cada vez más próximos a 620 pb, estableciéndose como óptimo 60 ciclos. Otro de los factores de los que dependía proporcionalmente la reconstrucción del tamaño original del fragmento génico codificante para el dominio-L fue la cantidad de ADN molde añadido, determinándose como más adecuada un 20% v/v con respecto al volumen total de la reacción (Figura 67R-C).

Finalmente, con el objeto de obtener una colección final de fragmentos mutantes con el tamaño correcto, se llevó a cabo una última PCR sobre los fragmentos reconstruidos, empleando oligonucleótidos cebadores específicos para el ADN que codifica para el dominio-L (Figura 67R-D). Durante la optimización del proceso se llevaron a cabo tres reacciones de amplificación, utilizando directamente el producto obtenido en la PCR de reconstrucción sin cebadores, diluido en proporciones 1/20, 1/40 y 1/100. Con las tres diluciones del ADN molde se obtuvo idéntico resultado por lo que se estableció como adecuada una dilución 1/100. Tras la realización de esta última PCR en las

condiciones descritas se obtuvo una colección de fragmentos génicos mutantes del tamaño correcto (620 pb) que fueron extraídos y purificados a partir de la correspondiente banda en un gel de agarosa (ver Materiales y Métodos).

Finalmente, tanto la colección de fragmentos génicos recombinados como la construcción pRSET-*dhak* fueron digeridos con las enzimas *Adel* y *HindII*, y sometidos al ligamiento de sus extremos cohesivos. De esta forma se obtuvo una genoteca de mutantes para el gen *dhak* completo en los cuales se había inducido variabilidad genética en la región codificante para el dominio-L de la proteína. La mezcla de ligamiento se transformó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y tras su incubación en medio sólido LB-ampicilina se obtuvieron unas 600 colonias aisladas, que constituyeron la primera generación de mutantes DHAK.

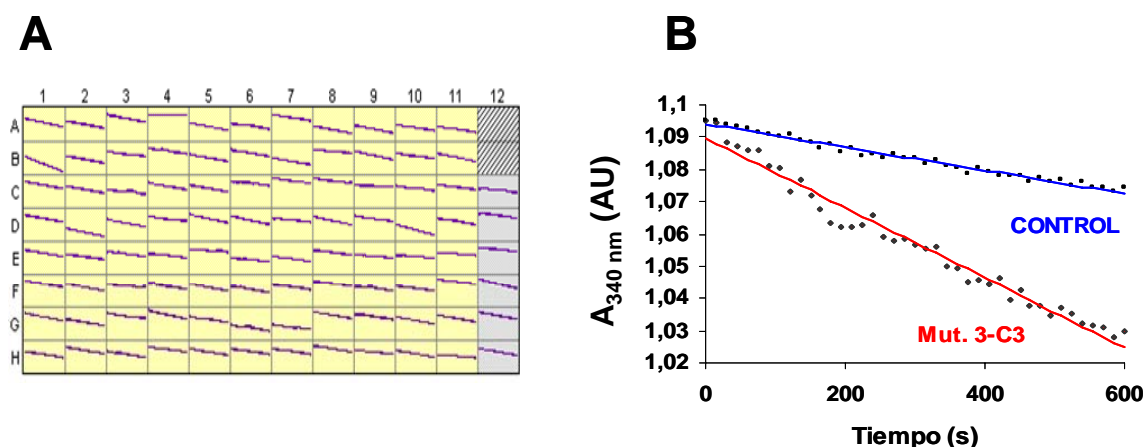
### **Screening mediante ensayo de actividad DHAK con poli-P<sub>i</sub>**

El auténtico cuello de botella del proceso de evolución dirigida es el diseño de un buen método de *screening*, dado que en general, la selección no se hace por presión selectiva del medio sino por la adquisición de una característica útil para su aplicación en síntesis enzimática (Cohen *et al.*, 2001; Aharoni *et al.*, 2005a). Por esta razón, es en el *screening* donde se introduce el criterio de selección, que en el caso de la evolución de la DHAK fue la capacidad de fosforilar DHA utilizando poli-P<sub>i</sub> como donador de fosfato. Para ello se diseñó un ensayo de actividad DHAK en presencia de poli-P<sub>i</sub>, muy similar al que se empleaba para determinar la actividad con ATP aunque con ligeras modificaciones, como incrementar ligeramente la concentración del donador de fosfato (ver Materiales y Métodos). De esta forma, introducimos un segundo criterio de selección: la enzima seleccionada no solo debe utilizar poli-P<sub>i</sub> como donador de fosfato sino que el exceso de este sustrato no debe afectar a su actividad, algo imprescindible para su posterior aplicación sintética.

El primer paso en el proceso de *screening* fue la obtención de las diferentes DHAKs mutantes para el dominio-L, obtenidas en la primera generación de evolución dirigida. Para ello se crecieron 540 de los clones recombinantes obtenidos en el proceso distribuidas en seis placas de 96-pocillos, en los cuales

se indujo la expresión de los mutantes DHAK. En cada placa se incluyeron 6 colonias control que expresaban la DHAK silvestre. Cada una de las placas se realizó por duplicado, de tal forma que una de las copias fue inmediatamente congelada tras el crecimiento del cultivo celular con el fin de preservar y expandir posteriormente aquellos clones cuya DHAK mutante resultase positiva para el empleo de poli- $P_i$  como donador. Los segundos cultivos celulares duplicados fueron lisados mediante lisozima y tratados para la obtención de su correspondiente fracción soluble celular (CFE), sobre el cual se analizó enzimáticamente la actividad quinasa empleando poli- $P_i$ .

Ante un posible descenso de absorbancia consecuencia de la oxidación inespecífica del NADH, puesto que se empleó el CFE en la valoración y no la proteína pura, fue imprescindible realizar un primer ensayo en ausencia del sustrato DHA para determinar el fondo inespecífico de oxidación del NADH. A continuación, se añadió el sustrato y la diferencia entre las pendientes de los ensayos, antes y después de la adición del sustrato, determinó la actividad de la enzima mutante (Figura 68R).



**Figura 68R.** *Screening* mediante ensayo de actividad de la primera generación de mutantes. **A:** Uno de los ensayos realizados en placas de 96-pocillos: los pocillos en gris son controles con la DHAK no mutada; los pocillos rayados son blancos de reacción y los pocillos en amarillo la población de DHAKs mutantes analizada. **B:** Diferencia de pendientes obtenidas con uno de los mutantes con capacidad de fosforilar la DHA empleando poli- $P_i$ , en ausencia (azul) y tras la adición (rojo) del sustrato DHA, utilizado para iniciar el ensayo de actividad.

Como referencia y durante todo el proceso, desde el crecimiento hasta la

valoración de actividad en el CFE, se utilizó una población control con el gen no evolucionado, con el objeto de determinar qué diferencias de pendientes podíamos considerar estadísticamente significativas con respecto a una población de DHAK silvestre sin alterar. La gran cantidad de datos generados durante el proceso de *screening* requirió la utilización de tratamientos estadísticos para lograr distinguir aquellos mutantes que tenían capacidad para utilizar poli- $P_i$  como donador significativamente más alta que la mostrada por la población control no mutada. El análisis de datos empleado (ver Materiales y Métodos) permitió distinguir entre aquellos mutantes de DHAK que son estadísticamente similares, o incluso peores que la población control en cuanto a su capacidad de utilizar poli- $P_i$ , de aquellos mutantes con una probabilidad significativa de haber adquirido la capacidad de emplear el nuevo donador para fosforilar DHA.

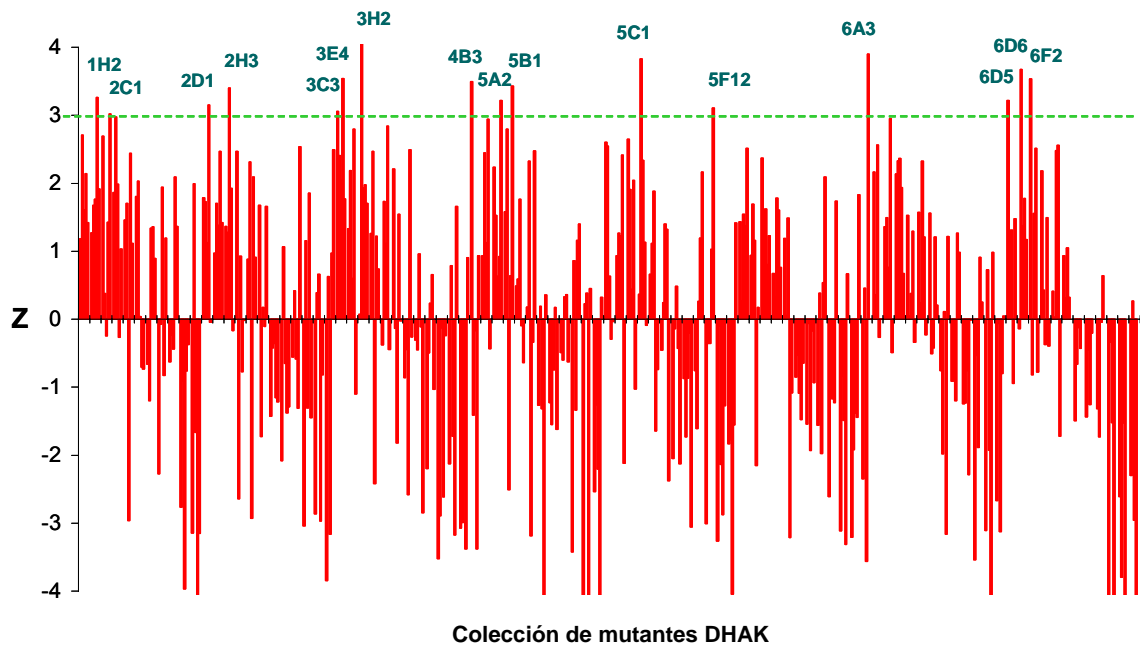
El análisis estadístico utilizado se basa en la comparación de dos poblaciones: la población de mutantes DHAK (**X**) y la población control con la enzima no mutada (**C**), para determinar qué individuos de **X** son estadísticamente diferentes al grupo **C** por exceso, siendo capaces de usar poli- $P_i$  como donador con una probabilidad significativamente alta. El análisis previo de los datos determinó que ambas poblaciones siguen una distribución normal o Gaussiana, por lo que fue posible emplear métodos estadísticos típicos de esta distribución como el de la hipótesis nula (ver Materiales y Métodos).

Se calculó la desviación típica de la población control no mutante ( $\sigma_c$ ) para obtener una distribución de la población mutante tipificada, lo cual se consiguió mediante el cálculo del parámetro estadístico  $Z$  (actividad tipificada) para cada uno de los individuos de **X**, teniendo en cuenta cómo se aleja cada uno de sus valores de actividad  $x_M$  con respecto a los de la población control **C**.

$$Z = \frac{(x_M - \mu_M)}{\sigma_c}$$

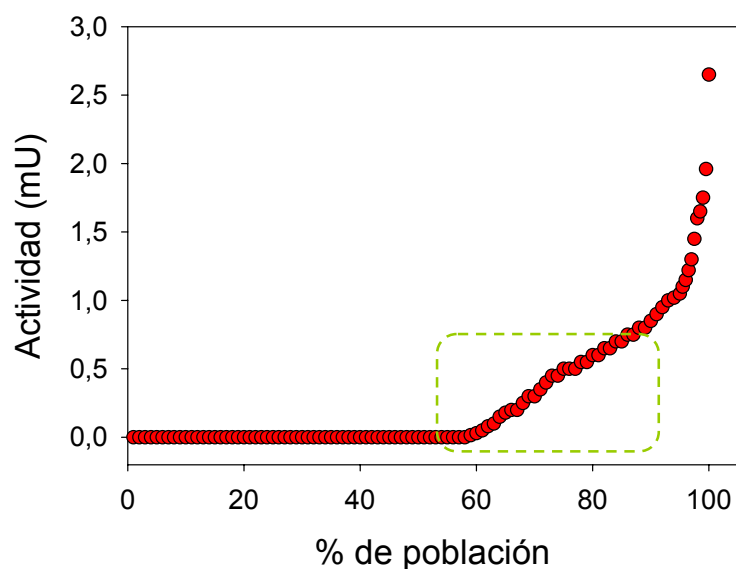
De esta manera, todos aquellos mutantes con  $Z \geq 3$  tienen al menos un 98% de probabilidad de no formar parte de la población normal y por tanto, de que la diferencia de pendientes encontrada responda realmente a actividad con el poli-

$P_i$ . Tras el análisis estadístico se localizaron 16 mutantes con  $Z \geq 3$ , es decir, la probabilidad de que estos 16 mutantes no catalicen la fosforilación dependiente de poli- $P_i$  es como máximo del 2% (Figura 69R).



**Figura 69R.** Representación del parámetro  $Z$  calculado para cada mutante analizado en la primera generación. Se indican los 16 mutantes con  $Z \geq 3$ , seleccionados como positivos.

Por lo tanto podemos concluir que un 3% de los mutantes obtenidos en la primera generación han evolucionado satisfactoriamente hacia formas capaces de utilizar poli- $P_i$  como donador de fosfato. Un análisis más detallado de la actividad de la población mutante con respecto al porcentaje de dicha población revela una distribución similar a la observada en otros procesos de Evolución Dirigida (Fong *et al.*, 2000; Miyazaki *et al.*, 2006), así como que el porcentaje de mutantes positivos obtenidos es bastante alto, si tenemos en cuenta que la población sometida a *screening* fue de tan solo 540 mutantes (Figura 70R).



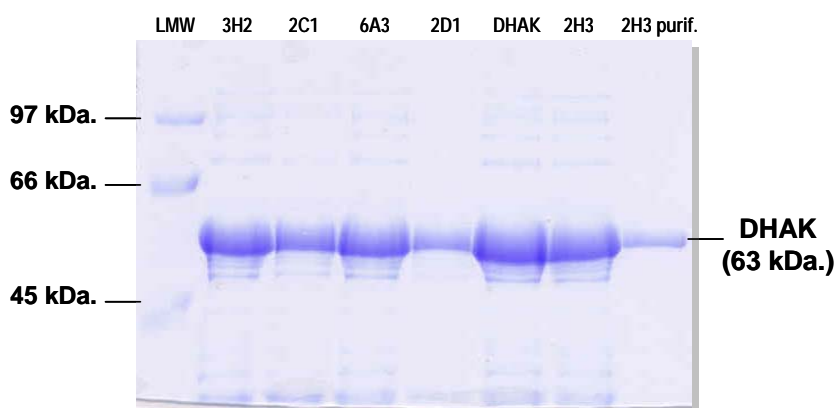
**Figura 70R.** Distribución de la actividad en presencia de poli- $P_i$  con respecto al porcentaje de la población mutante analizada en el proceso de *screening*. Se resalta el intervalo de incertidumbre en cuanto a la actividad obtenido con la población control de DHAK no mutada.

### Caracterización de los mutantes positivos de la primera generación

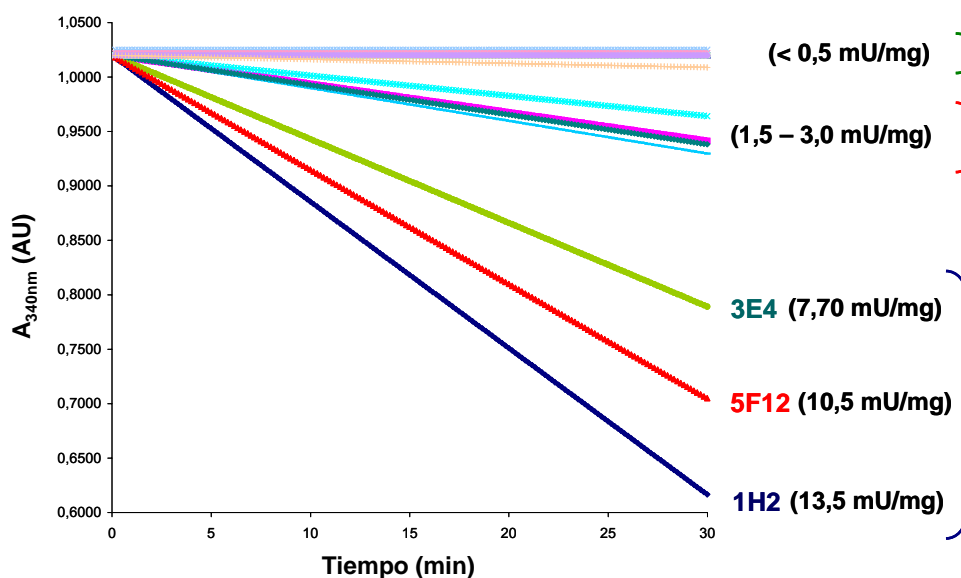
Para un análisis más detallado de su actividad y como verificación del método de *screening* utilizado, se sobre-expresaron y purificaron los 16 mutantes de la primera generación con valores de  $Z \geq 3$ . La expresión y purificación de los mutantes fue analizada mediante SDS-PAGE mostrando en todos los casos sobre-expresión de proteína con un tamaño de 63 kDa correspondiente a la DHAK (Figura 71R). La purificación de los mutantes se realizó mediante IMAC usando resinas de  $Ni^{2+}$ -IDA-agarosa.

La actividad específica de los mutantes purificados, previa valoración de su concentración de proteína, se evaluó mediante ensayo enzimático de actividad en presencia de poli- $P_i$  como donador de fosfato (Figura 72R). Las condiciones utilizadas en el ensayo fueron las mismas que se emplearon para el proceso de *screening* aunque en un volumen mayor de 1 ml, con el fin de incrementar la precisión del método de análisis (ver Materiales y Métodos).





**Figura 71R.** Un ejemplo del análisis mediante SDS-PAGE de la expresión y purificación de los mutantes DHAK obtenidos en la primera generación. Se muestran 5 de los mutantes positivos: 3H2, 2C1, 6A3, 2D1 y 2H3, para el cual también se muestra su purificado (2H3 purif.). LMW es el marcador de peso molecular y DHAK un control de expresión del enzima silvestre.



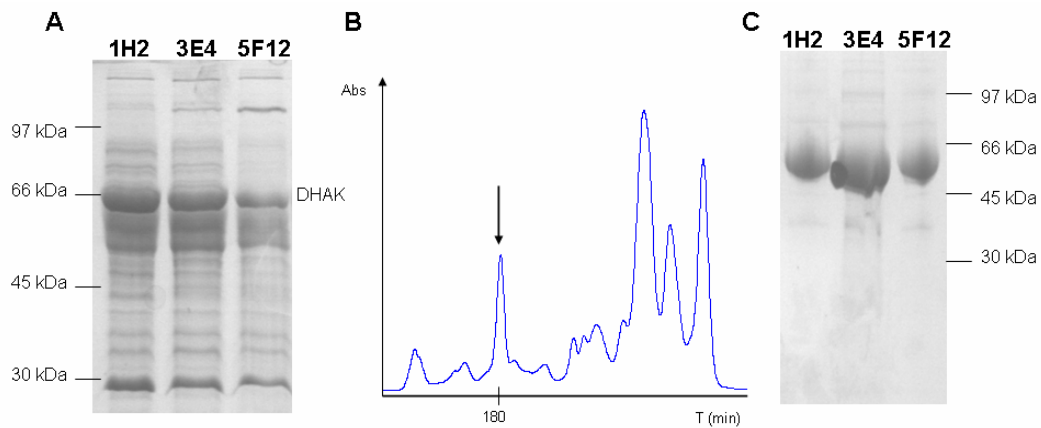
**Figura 72R.** Análisis espectrofotométrico de la actividad DHAK usando poli- $P_i$  valorada en los 16 mutantes asignados como positivos en la primera generación de evolución. Se indican los niveles de actividad específica calculados para cada mutante o grupo de mutantes.

Los resultados obtenidos para las enzimas purificadas permitieron clasificar a los mutantes positivos de la primera generación en tres grupos claramente diferenciados, en función de su actividad específica empleando poli- $P_i$  como donador de fosfato (Figura 72R): (i) los mutantes 1H2, 5F12 y 3E4, que muestran una actividad significativamente mayor al resto (entre 7 y 14 mU/mg); (ii) los mutantes 5A2, 5B1, 2C1 y 2H3, con una actividad específica intermedia

(entre 1,5 y 3,0 mU/mg); y (iii) el resto de mutantes —2D1, 3C3, 3H2, 4B3, 5C1, 6A3, 6D5, 6D6 y 6F2—, cuya actividad específica es baja o muy baja (igual o inferior a 0,5 mU/mg). La actividad para algunos de los mutantes pertenecientes al tercer grupo es comparable a la determinada para la DHAK silvestre en presencia de poli- $P_i$  como donador de fosfato (2D1, 4B3, 6A3, 6D5 y 6D6, con actividad < 0,5 mU/mg) por lo que podrían considerarse como falsos positivos del proceso de *screening*. Además, se valoró la capacidad de los 16 mutantes para fosforilar DHA en presencia de ATP, el donador natural de DHAK. Los resultados obtenidos indican que todos ellos mantienen un nivel de actividad específica similar a la calculada previamente para la DHAK silvestre. Este resultado indica que, durante el proceso de evolución dirigida, la adquisición de la nueva capacidad no ha alterado a la función principal. Simplemente se ha logrado una enzima menos específica hacia el donador de fosfato, pero sin alterar su capacidad inicial de utilizar ATP, que sigue siendo el sustrato predilecto para las proteínas mutadas.

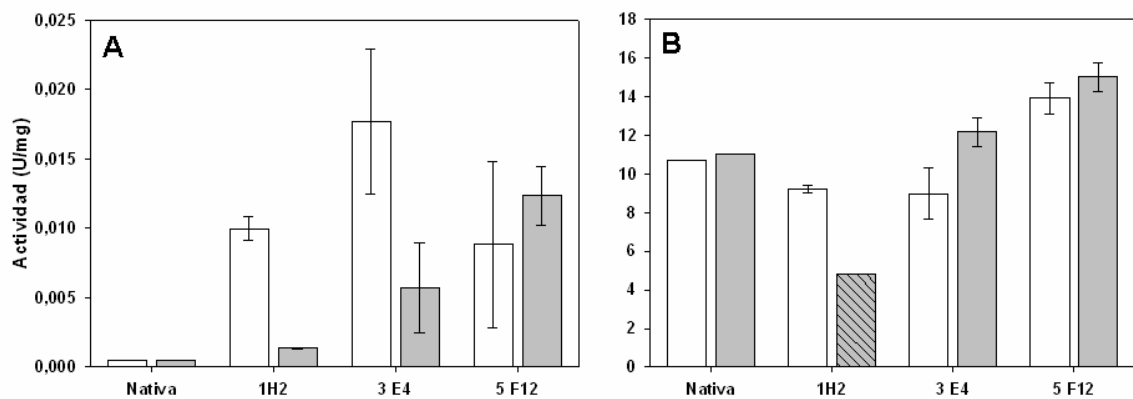
Los mutantes 1H2, 5F12 y 3E4 se sometieron a una caracterización más detallada y se analizó el comportamiento de la actividad quinasa en presencia tanto de  $Mg^{2+}$  como de  $Mn^{2+}$ . Además, se estudió como había sido modificada la actividad promiscua ciclasa durante el proceso de evolución. Los clones recombinantes correspondientes a los tres mutantes se crecieron en cultivos de 250 ml para la obtención de sus respectivas enzimas. Tras la inducción de los 3 mutantes, se comprobó por SDS-PAGE y en los 3 casos se expresaba una proteína de 63 kDa correspondiente a la DHAK, con niveles de proteína expresada de 31% (1H2), 23% (3E4) y 26% (5F12) (Figura 73R-A).

La purificación de las tres enzimas se realizó mediante IMAC y exclusión molecular (Figura 73R-B), tal y como se indicó para la DHAK silvestre (ver Materiales y Métodos). Al analizar la pureza de los liofilizados mediante tricina-SDS-PAGE, se determinaron purezas relativas para las proteínas obtenidas del 89% (1H2), 78% (3E4) y 77% (5F12) (Figura 73R-C).



**Figura 73R.** Purificación de las proteínas mutantes 1H2, 3E4 y 5F12. **A:** Gel SDS-PAGE de los extractos libres de células. **B:** Cromatograma de la purificación mediante exclusión molecular. (↓) Pico correspondiente a la DHAK. **C:** Gel tricina-SDS-PAGE de las fracciones purificadas.

La actividad quinasa de los 3 mutantes con poli- $P_i$  y  $Mg^{2+}$  como cofactor se ensayó enzimáticamente y por triplicado. Las actividades medidas fueron 9,98 mU/mg (1H2), 17,7 mU/mg (3E4) y 8,84 mU/mg (5F12) respectivamente. Cuando se valoró la misma actividad pero usando  $Mn^{2+}$  como cofactor, se comprobó que los tres mutantes eran activos: 1H2 y 3E4 tenían menos actividad que con  $Mg^{2+}$  (un 86% y un 68% menos, respectivamente), mientras que 5F12 presenta un aumento de actividad del 39% al cambiar el catión. (Figura 74R-A).

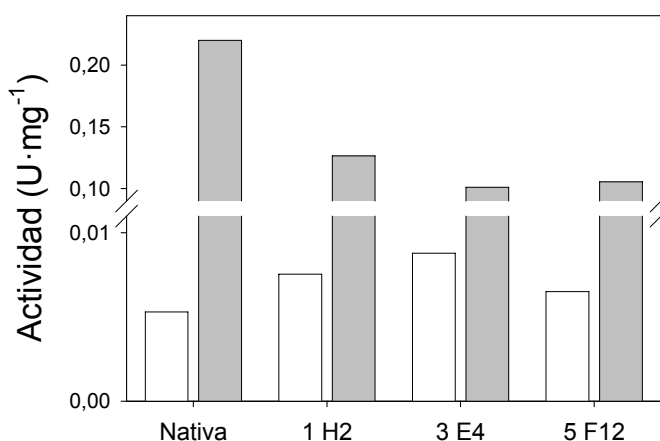


**Figura 74R.** Representación de las actividades específicas de los mutantes 1H2, 3E4 y 5F12, comparadas con las de la DHAK nativa. Las barras claras indican las medidas con  $Mg^{2+}$ , y las oscuras con  $Mn^{2+}$ . **A:** actividad quinasa con poli- $P_i$ . **B:** actividad quinasa con ATP.

Al ensayar la actividad quinasa dependiente de ATP (actividad nativa), comprobamos que los tres mutantes presentan comportamientos diferentes

entre ellos: los mutantes 1H2 y 3E4 tienen menor actividad quinasa que la proteína nativa, (ambos un 14%), mientras que el mutante 5F12 tiene un 30% más que la proteína nativa. En presencia de  $Mn^{2+}$ , esta actividad también se veía afectada: el mutante 3E4 tiene un 35% más de actividad con  $Mn^{2+}$  que con  $Mg^{2+}$ , y el mutante 5F12 tiene un 8% de aumento relativo (Figura 74R-B). Este dato no se pudo evaluar en el mutante 1H2 debido a la inestabilidad del liofilizado en las condiciones de almacenamiento.

En el análisis de actividad ciclasa, se observó que en los tres mutantes, aunque sigue siendo mayor con  $Mn^{2+}$  que con  $Mg^{2+}$ , sufre una disminución significativa con respecto al enzima silvestre en presencia de  $Mn^{2+}$  mientras que la situación es la opuesta en presencia de  $Mg^{2+}$  (Figura 75R). El mutante 3E4 es el que más se diferencia de la actividad FMN-ciclasa de la proteína silvestre, ya que presenta la menor actividad con  $Mn^{2+}$  y la mayor con  $Mg^{2+}$ .

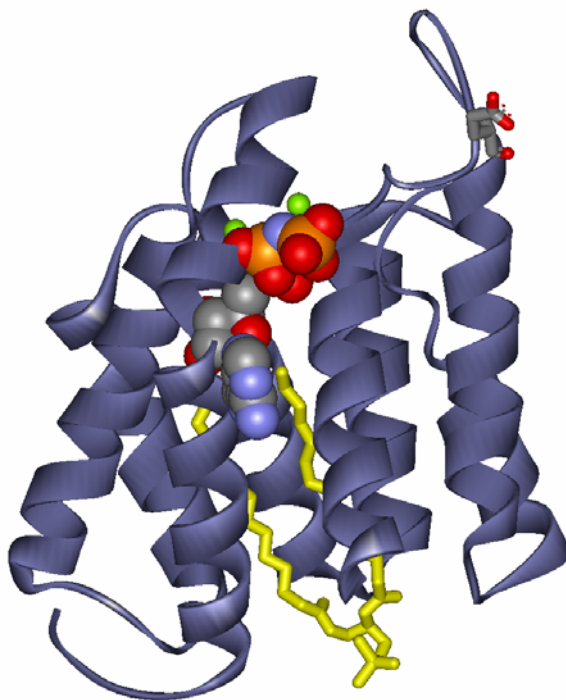


**Figura 75R.** Representación de las actividades específicas FMN-ciclasa de los mutantes 1H2, 3E4 y 5F12 comparadas con las de la DHAK silvestre. Las barras claras indican las medidas con  $Mg^{2+}$  y las oscuras con  $Mn^{2+}$ .

Dado que la estructura tridimensional de la DHAK de *C. freundii* DMS 30040 es conocida (Siebold *et al.*, 2003a), es posible localizar espacialmente las mutaciones aparecidas durante el proceso de evolución dirigida, previa secuenciación de los genes *dhak* presentes en los mutantes de la primera generación. Hasta ahora, sólo uno de los mutantes, el 1H2, ha sido secuenciado y su mutación localizada en su estructura cuaternaria (Figura 76R).

Este mutante presenta una única mutación (Glu526Lys) que se localiza en

uno de los 8 lazos desestructurados situados en la parte superior del barril de  $\alpha$ -hélices que forma el dominio-L de la proteína, cercano al sitio de unión a ATP. El lazo en cuestión está compuesto de 14 aminoácidos comprendidos entre la alanina 515 y la leucina 529 (Figura 76R).



**Figura 76R.** Estructura terciaria del dominio-L con el ATP (coloreado por elementos) unido a su sitio específico, en coordinación con dos iones  $Mg^{2+}$  (verde) y el fosfolípido estructural situado en su interior (amarillo). En *stick* se muestra el aminoácido glutamina 526 que ha sido sustituido por lisina en el mutante 1H2.

Esta mutación cambia una carga negativa del ácido glutámico por una positiva de la lisina. Dado que el poli- $P_i$  tiene cargas negativas, este cambio podría facilitar la correcta disposición del sustrato en el centro activo para que tenga lugar la transferencia del grupo fosfato a la DHA. Esta interpretación se ve respaldada en que la nueva carga positiva se sitúa en un lazo muy flexible que podría unir el poli- $P_i$  y orientarlo hacia el centro activo.

En lo que respecta al resto de mutantes, en el momento de la escritura de la presente memoria se está trabajando para la correcta secuenciación de sus genes *dhak* que permita situar cada alteración en la estructura de la proteína.



## DISCUSIÓN.

### **La DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es una nueva variante**

Como ya se expuso en el apartado de Resultados, existen notables diferencias entre la secuencia del gen *dhak* de la cepa CECT 4626 y la previamente descrita, correspondiente al gen de la cepa DMS 30040, ambas de *C. freundii*. Estas diferencias nos hacen postular que nos encontramos ante una nueva variante de dihidroxiacetona quinasa de *C. freundii*. Los datos manejados para formular esta hipótesis se exponen a continuación:

El gen clonado a partir de la cepa CECT 4626 de *C. freundii* contiene 117 nucleótidos mutados de un total de 1659 nucleótidos (un 7,1%) con respecto al de la cepa DMS 30040; una tasa de mutación de  $6,4 \times 10^{-3}$  mutaciones/pb, que supera ampliamente las  $8,0 \times 10^{-6}$  mutaciones/pb descritas para la *Taq* polimerasa en condiciones de PCR similares (Cline *et al.*, 1996). Además, las mutaciones obtenidas en el gen amplificado fueron coincidentes en seis colonias de transformantes distintas seleccionadas al azar, lo cual descarta completamente que las mutaciones se produjesen durante el proceso de amplificación por PCR.

La mayoría de las mutaciones en el genotipo son silenciosas (91 de las mutaciones, un 77,8 %) pues el codón alterado sigue codificando para el mismo aminoácido que la secuencia original debido a la degeneración del código genético. Esto es lógico pues la selección actúa sobre la proteína durante el proceso de evolución independientemente de la secuencia genotípica que la

codifique y una mutación silenciosa no afecta su función. Los 22 aminoácidos modificados en la variante presente en la cepa CECT 4626 no se distribuyen al azar a lo largo de la proteína. El mayor porcentaje de variación (22%) con respecto a la cepa DMS 3040 se encuentra la región conectora. Este hecho puede explicarse porque esta región tiene únicamente una función estructural de unión de los dos dominios con actividad catalítica, por lo que la presión selectiva sobre esta secuencia debe ser baja en términos evolutivos. Por otro lado, las mutaciones localizadas en los dominios catalíticos se sitúan siempre lejos de los sitios de unión de DHA y ATP, de acuerdo con la estructura cristalográfica de la DHAK de la cepa DMS 30040 (Protein Data Bank: 1UN9).

Por último, cabe destacar que la cepa DMS 30040 actualmente se encuentra clasificada en la especie *Citrobacter braakii* en la *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ) (<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/strains/strain.dsm030040.html>). Esto apoya las observaciones realizadas en este trabajo sobre sus notables diferencias con la cepa CECT 4626, que sí está catalogada como de *Citrobacter freundii*.

En este sentido, era interesante estudiar si las diferencias encontradas en la secuencia se traducían en un comportamiento bioquímico distinto al enzima de la cepa DSM 30040. En cuanto a las constantes cinéticas para el sustrato DHA de esta nueva variante de DHAK, el valor obtenido de  $K_M$  aparente es entre 3 y 5 veces menor al previamente descrito para otras DHAKs bacterianas (*C. freundii* DSM 30040, *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*; Tabla 1D), aunque se mantiene dentro del mismo orden de. Por el contrario, para las DHAKs de las bacterias *Gluconobacter suboxydans* y *Acetobacter xylinum* se han descrito valores de  $K_M$  bastante mayores (25 y 4170 veces mayores respectivamente). Para las DHAKs de levaduras, algas y animales, los valores de  $K_M$  con respecto a la DHA descritos en la bibliografía son, en general, entre 4 y 18 veces mayores que el calculado para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, con la excepción de la isoforma II de *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354 y las DHAKs citosólicas y mitocondriales de cerebro de rata, todas ellas con valores de  $K_M$  mucho mayores (43, 500 y 50 veces mayores respectivamente). En lo referente a la constante catalítica, la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 exhibe



valores de  $k_{cat}$  aparente con respecto al sustrato DHA entre 3 y 16 veces mayor al resto, salvo para las DHAKs de *C. freundii* DMS 30040, *S. pombe* IFO 0354 y riñón de cerdo, cuyas constante catalíticas son del mismo orden, aunque ligeramente inferiores. Es uno de los valores más altos de  $k_{cat}$  con respecto a la DHA, con la única excepción de la descrita para la DHAK de la isoenzima I de *S. pombe* IFO 0354, que es unas tres veces mayor (Tabla 1D).

**Tabla 1D.** Comparación de constantes cinéticas aparentes con respecto al sustrato DHA, descritas para DHAKs de diferentes organismos.

	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (mM <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )	Referencia
<b>BACTERIAS</b>				
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 4626	0,0012	1448	$3,2 \times 10^6$	Sánchez-Moreno <i>et al.</i> , 2009
<i>Citrobacter freundii</i> DMS 30040	< 0,0060	1050	$> 1,7 \times 10^5$	García-Alles <i>et al.</i> , 2004
<i>Escherichia coli</i>	< 0,0060	290	$> 4,9 \times 10^4$	García-Alles <i>et al.</i> , 2004
<i>Acetobacter xylinum</i>	5			Weinhouse y Benziman, 1976
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,004-0,005	550	$1,4 \times 10^5$	Johnson <i>et al.</i> , 1984
<i>Gluconobacter suboxydans</i>	0,03			Tachiki <i>et al.</i> , 1987
<b>LEVADURAS</b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Dhak I	0,022	110*	$5,0 \times 10^3$	Molin <i>et al.</i> , 2003a
Dhak II	0,005			Molin <i>et al.</i> , 2003a
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> IFO 0354				
Isoenzima I	0,01	3660*	$3,7 \times 10^5$	Itoh <i>et al.</i> , 1999
Isoenzima II	0,052	871*	$1,7 \times 10^4$	Yoshihara <i>et al.</i> , 1996
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h <sup>-</sup>	0,016			Marshall <i>et al.</i> , 1986
<i>Candida methylica</i>	0,011			Hofmann y Babel, 1990
<i>Candida boidinii</i>	0,006			Bystrykh <i>et al.</i> , 1990
<i>Hansenula polymorpha</i> CBS 4732	0,011			Kato <i>et al.</i> , 1988
<b>ALGAS</b>				
<i>Dunaliella parva</i>	0,01			Lerner y Avron, 1977
<i>Dunaliella salina</i> ‡	0,01	90*	$9,8 \times 10^3$	Lerner <i>et al.</i> , 1980
<b>MAMÍFEROS</b>				
<b>Cerdo (riñón)</b>	< 0,005	1378*	$> 2,8 \times 10^5$	Miwa <i>et al.</i> , 1994
<b>Rata (cerebro)</b>				
Mitocondrial ‡	0,6			Jenkins y Hajra, 1976
Citosólica ‡	0,06			Jenkins y Hajra, 1976
<b>Bovino (hígado)</b>	0,02			Heinz y Lamprecht, 1961

\* Valores calculados multiplicando  $V_{max}$  (U/mg) por el peso molecular de la DHAK, tomados de la referencia correspondiente.

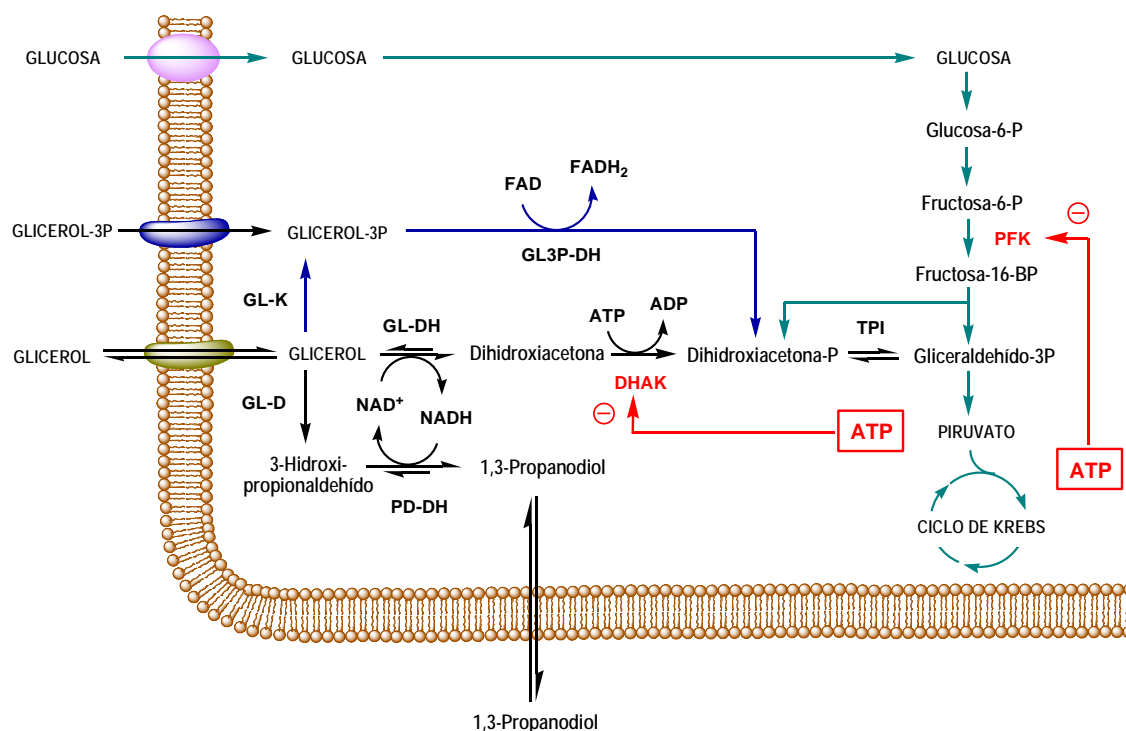
‡ DHAKs parcialmente purificadas.

La eficiencia catalítica  $k_{cat}/K_M$  calculada con respecto a la DHA ( $3,2 \times 10^6$  mM<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) es la más alta descrita en la bibliografía para una DHAK, y en particular es unas 9 veces mayor que la descrita para la isoenzima I de *S.*

*pombe* IFO 0354, la única DHAK que hasta el momento había sido utilizada para la síntesis de DHAP (Itoh *et al.*, 1999). La DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es por tanto un interesante biocatalizador para la obtención eficiente de DHAP, aunque al presentar una baja constante de inhibición con respecto al ADP debe ser utilizada en conjunción con un sistema de regeneración de ATP, para evitar así la acumulación del inhibidor en el medio de reacción (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004).

En contraste con la gran cantidad de datos existentes para la DHA, hay muy pocas referencias en la bibliografía sobre estudios cinéticos con respecto al sustrato MgATP. El valor de  $K_M$  aparente calculado para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 (0,35 mM) es 3,5 veces mayor a la descrita para la de la cepa DMS 30040 (García-Alles *et al.*, 2004), del mismo orden que la descrita para la DHAK de *K. pneumoniae* (Johnson *et al.*, 1984), y la mitad que la calculada para la isoenzima I de *S. pombe* IFO 0354 (Itoh *et al.*, 1999). Ateniéndonos únicamente a estos datos, no parece existir mucha diferencia, en lo referente al donador de fosfato, entre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 y otras previamente caracterizadas. Sin embargo, en esta nueva variante de DHAK hemos descrito un fenómeno de inhibición por exceso del sustrato  $[MgATP]^{2-}$  que no había sido descrito hasta la fecha para ninguna otra DHAK. Un patrón de inhibición por exceso de MgATP muy similar al descrito por nosotros para la DHAK se puede observar en las fosfofructoquinasas (PFKs), quinasas que actúan en el metabolismo central de la célula. Las PFKs (EC. 2.7.1.11) catalizan la fosforilación MgATP-dependiente de glucosa-6-fosfato para obtener glucosa-1,6-bifosfato, una etapa catalítica de vital importancia para el metabolismo de la célula, pues constituye el primer paso de la glicolisis (Nelson y Cox, 2004). Debido a su estratégica ubicación en el flujo metabólico, esta enzima está sujeta a una regulación extensiva, ya que su modulación permite distribuir la glucosa-6-fosfato entre la glicolisis y otra importante vía metabólica como es la ruta de las pentosas fosfato (Portais y Delort, 2002). La DHAK de *C. freundii* CECT 4626 presenta diversas similitudes con las PFKs. En lo referente a su papel metabólico, ambas son enzimas que catalizan una reacción de forma irreversible, se sitúan al comienzo de sus respectivas rutas metabólicas, y

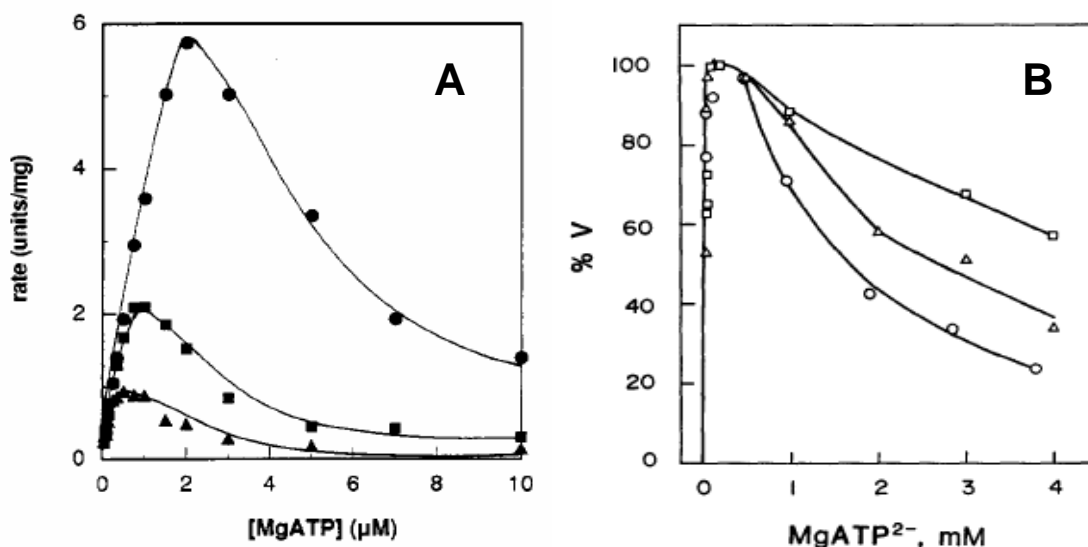
dichas rutas tienen como función la obtención de energía a partir de aquellas moléculas disponibles como nutrientes en el medio: la disimilación anaeróbica del glicerol, en el caso de la DHAK, y la glicolisis a partir de glucosa, en el caso de la PFK (Figura 1D). Estas características hacen de las dos enzimas puntos idóneos para el control del flujo metabólico, lo cual suele coincidir con enzimas altamente reguladas. Ese es el caso de las PFKs, que son enzimas reguladas alostéricamente por gran cantidad de efectores, tanto activadores (AMP, ADP, fructosa-2,6-bifosfato) como inhibidores (piruvato, citrato) (Nelson y Cox, 2004). Uno de estos inhibidores alostéricos es el ATP, que ejerce una regulación tipo *feedback* (Nelson y Cox, 2004).



**Figura 1D.** Esquema de la disimilación del glicerol en *C. freundii*, tanto en presencia de oxígeno (flechas azules) como en condiciones anaerobias (flechas negras), y su conexión con la glicolisis (flechas verdes). En rojo se muestra la inhibición retroalimentada producida por acumulación de ATP. Enzimas señaladas: glicerol quinasa (GL-K), glicerol deshidratasa (GL-D), glicerol deshidrogenasa (GL-DH), 3-hidroxi-propionaldehído deshidrogenasa (PD-DH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GL3P-DH), triosafosfato isomerasa (TPI), dihidroxiacetona quinasa (DHAK) y fosfofructoquinasa (PFK).

Por todo ello, hipotetizamos que la inhibición de la DHAK por exceso de ATP responde a un mecanismo de inhibición alostérica similar al descrito para las

PFK. Como se ha comentado en el apartado de Resultados, la inhibición por exceso de MgATP de la DHAK no concuerda con una clásica inhibición por exceso de sustrato. Sin embargo, se asemeja bastante al patrón de inhibición de Pfk-1 (Zheng y Kemp, 1992) y Pfk-2 (Guixé y Babul, 1985) presentes en *E. coli* (Figura 2D).



**Figura 2D.** Actividad de las PFKs de *E. coli* en función de la concentración del sustrato MgATP. **A:** Cinéticas de la Pfk-1 con respecto al MgATP realizadas a diferentes concentraciones de fructosa-6-fosfato: 50 μM (●), 25 μM (■) y 10 μM (▲). Tomada de Johnson y Reinhart, 1992. **B:** Actividad de la Pfk-2 en función de la concentración de MgATP a diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> libre: 1 mM (○), 10 mM (Δ) y 30 mM (□). Tomada de Guixé y Babul, 1985.

Desde hace unos años se han descrito en la bibliografía claras evidencias experimentales de que Pfk-2 de *E. coli* posee un sitio alostérico de unión a MgATP, cuya ocupación produce una brusca inhibición de la actividad quinasas del enzima (Campos *et al.*, 1984; Guixé y Babul, 1985; Guixé *et al.*, 1998). La confirmación ha llegado en un reciente estudio en el cual se cristalizó la proteína junto a dos moléculas de MgATP unidas tanto al sitio catalítico como al alostérico (Cabrera *et al.*, 2008). Según este trabajo, dos moléculas de MgATP se unen a sitios específicos situados muy próximos espacialmente; el ATP catalítico interacciona primero con la proteína mediante la coordinación a dos iones Mg<sup>2+</sup>, y comparte uno de los iones de tal forma que la unión del MgATP al sitio alostérico solo se produce cuando ya está unido el MgATP catalítico. Este mecanismo de interacción posibilita que la inhibición alostérica solo se produzca

a altas concentraciones de MgATP en el medio.

Recapitulando las similitudes que la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 presenta con respecto a Pfk-2, estas no solo se manifiestan a nivel de patrón cinético inhibitorio sino también a nivel estructural. Las dos enzimas son proteínas homodiméricas y ambas requieren dos iones  $Mg^{2+}$  en su centro activo para la catálisis, dotando al ATP de una carga neta nula al interaccionar con la proteína, algo realmente inusual en lo que respecta a las quinasas (ver Introducción). Bien es cierto que la DHAK de la cepa DMS 30040 ha sido cristalizada y solo se aprecia un único sitio de unión para el ATP, junto con dos  $Mg^{2+}$  en el dominio catalítico (Siebold *et al.*, 2003a). No obstante, las condiciones para la obtención de cristales a partir del enzima soluble indican que se emplearon concentraciones de ATP total de 5 mM, acompañado de 10 mM de  $MgCl_2$ . Si nos atenemos a nuestros datos experimentales, la inhibición por exceso de sustrato en la DHAK de la cepa CECT 4626 se manifiesta a concentraciones de  $[MgATP]^{2-}$  superiores a 7 mM, con lo cual es posible que en las condiciones de cristalización no se haya alcanzado la concentración necesaria para forzar la unión en el sitio alostérico.

Si bien existen indicios sólidos para sostener la hipótesis de una inhibición alostérica de la DHAK, son necesarios más experimentos para demostrar inequívocamente su existencia e intentar determinar el sitio de unión alostérico.

### **La promiscuidad catalítica natural DHAK de *C. freundii* CECT 4626 y sus implicaciones evolutivas**

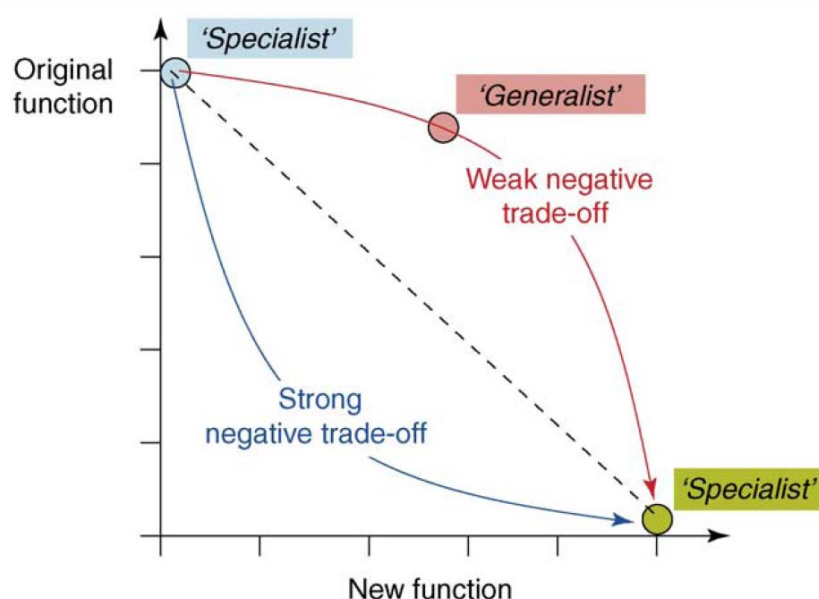
El gradualismo es un fenómeno fundamental en la evolución. Los cambios se producen en pequeños incrementos, de forma continua y gradual, pero durante todo ese proceso la integridad y viabilidad del organismo que lo sufre no puede ser comprometida. Este hecho genera un interrogante: ¿cómo los organismos vivos son capaces de adquirir nuevas funciones complejas a nivel molecular sin autodestruirse en el proceso?. Básicamente existen dos posibilidades para

adquirir una nueva habilidad catalítica: bien mediante la apropiación de una enzima presente en otro organismo capaz de catalizar la nueva función, empleando la transferencia horizontal de material genético, o bien mediante el aprovechamiento y desarrollo de un sitio activo ya existente, capaz de catalizar la nueva transformación de forma sub-óptima. El mecanismo mediante el cual se desarrolla esta última estrategia se denomina promiscuidad catalítica.

La promiscuidad catalítica puede definirse como la habilidad de una enzima de catalizar más de una transformación química (Kazlauskas, 2005; Bornscheuer y Kazlauskas, 2004), y es un concepto que en los últimos años ha adquirido gran importancia por sus implicaciones en diferentes campos de la enzimología, como la biocatálisis, ingeniería enzimática y evolución de enzimas (Khersonsky *et al.*, 2006; Hult y Berglund, 2007; Nobeli *et al.*, 2009). Las metaloenzimas suponen un caso especial de promiscuidad catalítica (Armstrong, 2000; Fernández-Gacio *et al.*, 2006). Dada la variedad de cationes metálicos que se pueden incorporar en su centro activo, el rango de transformaciones químicas que pueden ser catalizadas por la enzima se incrementa enormemente. Así, existen varios ejemplos en los que se demuestra que la modificación de la metaloenzima, bien a través de la unión covalente de ligandos que incorporan metales divalentes, o bien mediante la incorporación del ión metálico por sí solo en un centro que permita su coordinación, es una estrategia que ha permitido obtener enzimas con propiedades catalíticas modificadas e incluso actividades completamente nuevas (van de Velde *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002; Okrasa y Kazlauskas, 2006).

La promiscuidad catalítica natural proporciona el punto de partida necesario para la evolución darwiniana de las enzimas, de forma gradual y progresiva, tal y como demuestran numerosas evidencias experimentales sobre la plasticidad y la capacidad evolutiva de diferentes funciones promiscuas (Aharoni *et al.*, 2005b; Afriat *et al.*, 2006). Con estas evidencias, el modelo evolutivo más aceptado es aquel según el cual las proteínas adquieren nuevas funciones sin pérdida de la actividad enzimática original, y en el cual la duplicación génica podría ser el paso siguiente que permitiría al organismo obtener la nueva habilidad catalítica (Figura 3D) (Khersonsky *et al.*, 2006).

Según este mecanismo evolutivo, un organismo dispone de una enzima E1, capaz de catalizar una determinada transformación química de forma eficiente. Sin embargo, la enzima E1 también es capaz de catalizar una segunda transformación química, pero con mucha menor eficiencia que la primera; es decir, tiene una actividad promiscua natural. En algún momento, el gen que codifica para E1 puede duplicarse en el genoma, una estrategia que se ha revelado bastante común en el proceso evolutivo de los organismos vivos. En esta segunda copia del gen E1 la actividad promiscua está liberada para evolucionar sin comprometer la integridad del organismo, puesto que siempre existe una primera copia que realizará las funciones propias de la actividad principal. De esta forma, si existe una presión selectiva positiva hacia la nueva actividad promiscua, ésta se desarrollará independientemente de la principal, permitiendo adquirir la nueva función con una eficiencia comparable a la principal, en caso de ser útil para la supervivencia del organismo.



**Figura 3D.** Posibles rutas para la adquisición de una nueva función. En ambos casos conviven la función principal y la secundaria, siendo la más común aquella en la cual la pérdida de la función original es muy leve (línea roja), mientras que la pérdida drástica de esta función inicial en detrimento de la nueva función (línea azul) es minoritaria (Khersonsky *et al.*, 2006).

En el trabajo desarrollad a lo largo de la presente Tesis, hemos conseguido capturar una instantánea del proceso evolutivo de un enzima con promiscuidad catalítica. La comparación de los datos obtenidos con los previamente descritos

para la enzima presente en el hígado de rata es coherente con el mecanismo evolutivo previamente propuesto (Aharoni *et al.*, 2005b; Afriat *et al.*, 2006). Así, los datos sugieren que la nueva función FMN-ciclasa observada en la enzima de rata ha evolucionado en la naturaleza a partir de una actividad promiscua preexistente, tal y como se muestra en la enzima bacteriana, que ha sido progresivamente incrementada y actualmente se mantiene como una función secundaria de las proteínas en organismos superiores, sin afectar a su capacidad catalítica inicial (Wagner, 2005). No obstante, no es posible establecer comparaciones sobre el efecto de la presión selectiva en la evolución del enzima, puesto que la función real de la actividad FMN-ciclasa y de su producto, el cFMN, como metabolito son hasta el momento, desconocidas.

La confirmación del modelo evolutivo propuesto es de gran importancia, pues no solo tiene importantes implicaciones en la evolución divergente de proteínas sino que, además, su comprensión y correcta aplicación permite el diseño de nuevos biocatalizadores con capacidades catalíticas alternativas obtenidas a partir de funciones promiscuas latentes (Yoshikuni *et al.*, 2006).

Por otra parte, nuestro trabajo nos ha permitido también explicar el mecanismo enzimático que permite emplear dos actividades catalíticas en la misma proteína. Variando tan solo la concentración de  $Mn^{2+}$  presente en el medio de reacción, *C. freundii* mantiene la capacidad de catalizar las dos transformaciones catalíticas, modulando su actividad en función de las necesidades mediante regulación de la concentración citosólica de  $Mn^{2+}$ , y todo ello sin necesidad de duplicación génica como se creía hasta la fecha que debía transcurrir todo proceso evolutivo. Por lo tanto, con los datos aportados se demuestra que las DHAKs podrían haber evolucionado mediante una variante del mecanismo generalmente aceptado, mediante el cual se ha desarrollado una nueva actividad secundaria a partir de una promiscuidad catalítica latente sin necesidad de duplicación génica, utilizando mecanismos de regulación molecular que permiten coexistir a las actividades quinasa y ciclasa.



## **Aplicabilidad sintética de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en el contexto del sistema multienzimático**

Como se ha indicado en la Introducción, las aldolasas dependientes de DHAP tienen limitada su aplicabilidad sintética debido a su gran dependencia de la DHAP, un sustrato caro desde el punto de vista comercial y lábil a pHs neutros y básicos, que es el rango óptimo para su funcionamiento.

En la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado un sistema multienzimático que permite la síntesis de DHAP y GA3P con altos rendimientos, así como su acoplamiento a la acción de diferentes aldolasas dependientes de DHAP para la formación *one-pot* de enlaces C-C a partir de DHA (Sánchez-Moreno *et al.*, 2004). La fosforilación de la DHA está catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 con consumo de ATP, siendo necesaria su regeneración catalizada por la AK de *E. coli*, usando acetil-P como donador de fosfato. Esta regeneración permite economizar un sustrato caro como es el ATP y evita la acumulación de ADP, que es inhibidor de la DHAK. Por otro lado, el acoplamiento *one-pot* de una aldolasa dependiente de DHAP permite llevar a cabo la reacción aldólica de manera simultánea a la formación de la DHAP, evitando pasos intermedios de purificación.

La fosforilación de DHA, un sustrato barato y accesible, es una de las formas más directa para obtener DHAP. Ateniéndonos a la capacidad de síntesis de DHAP empleando DHA como sustrato, el sistema multienzimático desarrollado durante la presente Tesis presenta ciertas ventajas en comparación con otros métodos similares descritos en la bibliografía (Tabla 2D). La obtención de DHAP utilizando la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 permite obtener rendimientos del 100 % con respecto al sustrato DHA, obteniéndose un medio final de reacción muy limpio puesto que solo se puede encontrar acetato, fosfato (el acetil-P se degrada cuando se acidifica el medio para evitar la degradación de la DHAP) y restos de tampón (entre 5 mM y 20 mM, entre los cuales también se puede utilizar el fosfato). Tanto ATP como MgSO<sub>4</sub> se utilizan en muy baja concentración: 3,3 mM y 12,5 mM respectivamente. Bien es cierto que la

concentración final de DHAP en el medio es la más baja de todos los métodos descritos, pero esta circunstancia no supone ningún problema para su posterior utilización en reacciones enzimáticas.

**Tabla 2D.** Rutas enzimáticas para la síntesis de DHAP a partir de DHA.

Referencias	Pasos	Enz. <sup>[a]</sup>	Donador de P	Escala	Rend. <sup>[b]</sup>	Composición <sup>[c]</sup>
Sánchez-Moreno <i>et al.</i> (2004)	1	DHAK, AK	ATP (regenerado con acetil-P)	1,8 g (200 ml)	100 %	50 mM DHAP 100 mM acetato 50 mM P <sub>i</sub>
Crans y Whitesides (1985a,b)	1	GK, AK	ATP (regenerado con acetil-P)	66 g (1,4 L)	98 %	280 mM DHAP 320 mM acetato 40 mM P <sub>i</sub>
van Herk <i>et al.</i> (2006)	1	AP	PP <sub>i</sub>	0,2 g (10 ml)	20 %	100 mM DHA 400 mM DHAP 1,4 M P <sub>i</sub>
D'Arrigo <i>et al.</i> (1995)	2	PLC PLD	Fosfatidil colina (PC)	0,3 g (9 ml)	3 %	42 mM DHAP 42 mM DAG 16 mM PC

**[a]** DHAK: dihidroxiacetona quinasa, AK: acetato quinasa; GK: glicerol quinasa; AP: fosfatasa alcalina; PLC: fosfolipasa C; PLD: fosfolipasa D.

**[b]** Rendimientos finales con respecto a al DHA inicial.

**[c]** Composición final del medio de reacción. Se han omitido las concentraciones finales de tampón, ATP y sales, y se considera que la DHAP no se ha degradado a metilglioxal.

En cuanto al número de enzimas utilizadas, todos los métodos requieren dos a excepción del que emplea la reversibilidad de la fosfatasa alcalina (AP), usando PP<sub>i</sub> como donador de fosfato (van Herk *et al.*, 2006). Sin embargo, este método presenta el inconveniente de su bajo rendimiento, puesto que a valores superiores de concentración de DHAP la fosfatasa comienza a eliminar grupos fosfato en vez de transferirlos a la DHA. Sin embargo su mayor desventaja es que necesita partir de grandes cantidades de DHA y PP<sub>i</sub> para desplazar el equilibrio hacia la formación de DHAP y no hacia su desfosforilación, con lo que se genera un medio final bastante sucio que puede interferir con futuras reacciones enzimáticas acopladas, limitando su aplicabilidad sintética y dificultando la purificación de los productos generados. No obstante, con este sistema enzimático se ha logrado acoplar con éxito a la síntesis *in situ* de DHAP a la acción de la aldolasa RAMA, alcanzando buenos rendimientos en la

adición aldólica con propionaldehído: un 95 % con respecto al aldehído inicial (95 mM), aunque el rendimiento se reduce al 19 % si se realiza con respecto a la DHA inicial (van Herk *et al.*, 2006). Los resultados descritos son interesantes pero tan solo se han comprobado con un aldehído y una aldolasa dependiente de DHAP, por lo que sería necesario un estudio más profundo para verificar su aplicabilidad sintética, puesto que la alta concentración de PP<sub>i</sub> utilizada podría actuar como inhibidor de algunas aldolasas. Además, el uso de una enzima fosfatasa tiene el inconveniente de necesitar un continuo control del equilibrio para desplazar su catálisis hacia la formación de enlaces fosfato, por lo que en ocasiones se podría producir la defosforilación parcial del producto final, originando una mezcla de aldoles con y sin grupo fosfato.

El único de los métodos descritos comparable al sistema multienzimático con la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es el que emplea la glicerol quinasa (GK) como enzima para la fosforilación de DHA (Crans y Whitesides, 1985a,b). El método de reacción es básicamente similar y la composición final del medio muy parecida, aunque la GK ha sido utilizada para síntesis a mayor escala, llegando a 66 g. Hasta el momento la DHAK se ha utilizado en reacciones a escala de 1,8 g como máximo, aunque de los datos obtenidos no se desprende ninguna limitación en su escalado hacia mayores cantidades de producto. La principal ventaja de la DHAK con respecto a la GK es su eficiencia catalítica; la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es mucho más eficaz y específica para la fosforilación de DHA, con un valor de  $k_{cat}/K_M$  aparente de  $1,98 \times 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , que es el valor más alto de eficiencia catalítica descrito hasta la fecha para una quinasa capaz de fosforilar DHA. Esto permite utilizar cantidades menores de proteína en la reacción y alcanzar el máximo rendimiento en tan solo una hora, evitando así la degradación de DHAP en el medio.

Además, el sistema multienzimático basado en la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 también puede emplearse para la síntesis de D-GA3P, siguiendo procedimientos experimentales similares a los descritos para la formación de DHAP, por lo que mantiene todas sus ventajas y posibilita su utilización posterior en nuevas reacciones químicas y enzimáticas.

En cuanto a los métodos enzimáticos para la síntesis de DHAP que no parten

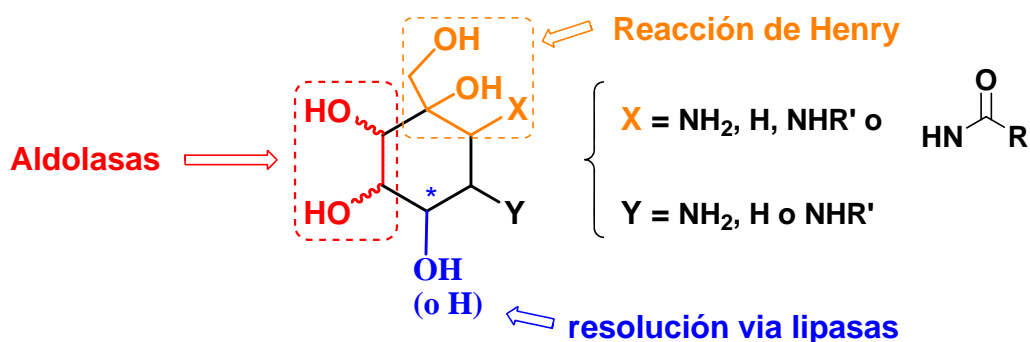
de DHA, existen dos métodos multienzimáticos que imitan a la glicolisis para obtenerla a partir de azúcares como la fructosa-1,6-bifosfato (Bednarski *et al.*, 1989) o la sucrosa (Fessner y Walter, 1992). El principal inconveniente de estos sistemas es la gran cantidad de enzimas que requiere para su aplicación y la complicación de integrar la síntesis *in situ* de DHAP a la acción de las aldolasas en estrategias *one-pot*, por la posibilidad de reacciones cruzadas que afecten al rendimiento final, puesto que estas estrategias requieren la utilización de TIM. Como ya se ha demostrado en los Resultados de la presente Tesis, las FBPA son especialmente sensibles a la contaminación por TIM en el medio de reacción, puesto que se puede generar D-GA3P, sustrato natural de la aldolasa, dando lugar a mezcla de productos. En este sentido también se ven limitados para su aplicación conjunta con aldolasas todos métodos de síntesis de DHAP que requieren TIM, a no ser que su propósito sea la formación del monosacárido natural catalizado por FBPA o TBPA (Eyrisch *et al.*, 1993).

El único sistema multienzimático de eficiencia contrastada para su aplicación conjunta con aldolasas es el descrito por Fessner y Sinerius (1994) basado en la glicerol oxidasa. Podemos destacar que el sistema multienzimático aquí descrito permite la síntesis del aldol en un solo paso a partir de DHA, dada la compatibilidad en las condiciones de reacción de los enzimas que emplea, mientras el sistema de la glicerol oxidasa necesita, en todas sus variantes, al menos dos pasos como consecuencia de las condiciones oxidantes del medio de reacción. Además, estas condiciones no sólo afectan al resto de enzimas involucradas en la reacción, sino que pueden afectar a la estabilidad de los aldehídos empleados como sustrato.

A la vista de los resultados obtenidos en la aplicación del sistema multienzimático con RAMA, Rha-1PA y Fuc-1PA podemos afirmar que el sistema descrito es una herramienta muy útil para la formación de enlaces C-C, ya que ha demostrado ser un sistema muy robusto, que se puede aplicar a distintas aldolasas dependientes de DHAP y a una batería de aldehídos de diversidad estructural. Además, la posibilidad de aplicar una estrategia en un paso o dos pasos le confiere una gran versatilidad, pudiendo ajustarse a condiciones de reacción como la presencia de co-disolventes o el empleo de

aldehídos que sean malos sustratos de la aldolasa empleada. Un ejemplo sobre su interesante aplicabilidad sintética es el descubrimiento de que un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado como el etil-3-metil-4-oxocrotonato puede actuar como sustrato de las aldolasas RAMA, Fuc-1PA y Rha-1PA en el contexto del sistema multienzimático, posibilitando la síntesis enantiocomplementaria de alcoles altamente funcionalizados.

Otro buen ejemplo de la utilidad sintética del sistema multienzimático es que la metodología desarrollada está siendo utilizada en colaboración con el grupo de la Dra. Marielle Lemaire, de la Universidad Blaise Pascal, para la síntesis de compuestos análogos a la valiolumina que puedan actuar como inhibidores de glicosidasas (El Blidi *et al.*, 2006). Estos compuestos también se están ensayando como chaperonas moleculares de glicosidasas lisosomales, y por lo tanto para el tratamiento de ciertas variantes de la enfermedad de Pompe, provocada por deficiencias en la maduración de estas enzimas (Suzuki, 2006; Okumiyama *et al.*, 2007). La utilización del sistema multienzimático facilita la formación de los nuevos aminociclitales mediante adición aldólica y posibilita la síntesis de compuestos enantiocomplementarios con el uso alternativo de RAMA, Rha-1PA y Fuc-1PA (Figura 4D). Los resultados de dicho trabajo son muy interesantes pero se encuentran en las primeras etapas de desarrollo, por lo que no se han incluido en la presente memoria (Camps-Bres *et al.*, 2009).



**Figura 4D.** Esquema general para la síntesis de análogos a la valiolumina. El uso de diferentes aldolasas permite generar compuestos enantiocomplementarios.

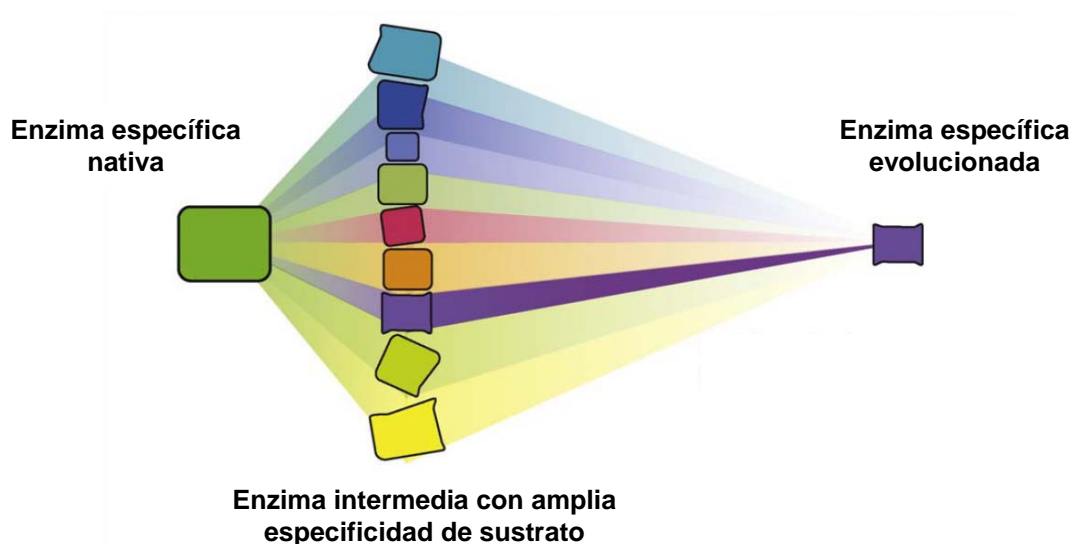
## **Evolución dirigida de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 para modificar su especificidad de sustrato**

A pesar de las múltiples ventajas y de la probada aplicabilidad sintética que presenta el sistema multienzimático, decidimos dar un paso más para intentar mejorarlo desde el punto de vista operacional y económico. Por esta razón se siguieron dos estrategias en paralelo, basadas en la ingeniería de proteínas pertenecientes al sistema multienzimático: (i) la fusión de una aldolasa con la DHAK en la misma cadena polipeptídica y (ii) la evolución de la DHAK para modificar la especificidad hacia el sustrato donador de fosfato desde ATP hasta poli- $P_i$ , mucho más económico y que elimina la necesidad de regenerar el sustrato. Las dos estrategias son útiles en si mismas y proporcionan ventajas catalíticas y operacionales al sistema multienzimático para la formación de enlaces C-C, pero su diseño se concibió de forma conjunta con el objetivo de hacerlas converger en el futuro, cuando ambas aproximaciones hayan sido completamente desarrolladas y optimizadas. De esta forma, sería posible obtener enzimas fusión entre la DHAK evolucionada y diferentes aldolasas dependientes de DHAP, consiguiendo un sistema multienzimático para la formación estereoselectiva de enlaces C-C compuesta de una única enzima, sin necesidad de regeneración del sustrato donador de fosfato, y con la ventaja catalítica de una mejor transmisión de los sustratos entre centros activos gracias a su proximidad y correcta orientación espacial.

Bajo esta perspectiva, una parte del trabajo mostrado en la presente memoria se centró en iniciar y desarrollar la segunda de las aproximaciones: la modificación de la especificidad hacia el sustrato donador de fosfato de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, con el fin de que sea capaz de utilizar poli- $P_i$  en vez de ATP como donador de fosfato.

El primer reto al que nos enfrentamos en este proyecto fue la alta especificidad hacia el sustrato ATP que presenta la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, puesto que durante su caracterización bioquímica no fue capaz de fosforilar DHA en presencia de cualquier otro donador de fosfato, desde NTPs

hasta poli-P<sub>i</sub>. Desde este punto de vista, la técnica de Evolución Dirigida ha demostrado ser muy eficaz para la transformación de enzimas específicas para un determinado sustrato en nuevas enzimas con un perfil de especificidad más amplio (Tracewell y Arnold, 2009). Este proceso de evolución a menudo transcurre a través de las llamadas *enzimas generalistas*, que presentan una baja actividad con el nuevo sustrato en las etapas iniciales del proceso, aunque puede incrementarse considerablemente incrementando los ciclos de evolución, hasta obtener una nueva enzima que deja de ser *generalista* y se convierte en específica para el nuevo sustrato (Figura 5D).



**Figura 5D.** Evolución dirigida de una actividad enzimática hacia el empleo de un nuevo sustrato a través de un intermedio *generalista* con un rango de especificidad más amplio. La figura está tomada de Tracewell y Arnold, 2009.

Además, este proceso de transición a través de *enzimas generalistas* está en consonancia con las actuales teorías de evolución de proteínas, que muestran que esta vía es la más común para la adquisición de nuevas capacidades en procesos evolutivos enzimáticos (Figura 3D). Según esta teoría, el modelo evolutivo más aceptado es aquel según el cual las proteínas adquieren nuevas funciones sin pérdida de la actividad enzimática original, y en el cual la duplicación génica podría ser el paso siguiente que permitiría al organismo obtener la nueva habilidad catalítica (Khersonsky *et al.*, 2006).

Estos aspectos evolutivos son muy interesantes pues reflejan exactamente lo

sucedido durante el proceso de evolución dirigida realizado sobre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. En dicho proceso se partió de una enzima muy específica para el sustrato ATP, que después de tan solo una ronda de evolución se ha transformado en varias *enzimas generalistas* en sus primeras etapas, pues exhiben una pequeña actividad empleando poli-P<sub>i</sub> como donador de fosfato, considerablemente superior a la de la enzima nativa pero aún muy alejada de la actividad con el sustrato natural. Además, la adquisición de la nueva habilidad catalítica en las nuevas enzimas apenas ha modificado la actividad inicial, pues todas ellas son capaces de fosforilar DHA utilizando ATP. Este hecho está en consonancia con la mayoría de los procesos evolutivos, tanto naturales como *in vitro*, en los cuales los intermedios *generalistas* no sufren una drástica pérdida de la actividad inicial, sino gradual y progresiva.

Otro de los aspectos llamativos del proceso de evolución *in vitro* llevado a cabo sobre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 ha sido el inesperado éxito de la estrategia. Partiendo de una colección de 540 mutantes, pequeña para lo que suele ser habitual en este tipo de técnicas, se obtuvieron 16 mutantes positivos (3% del total) localizados mediante *screening* por ensayo de actividad con poli-P<sub>i</sub>. Bien es cierto que, al analizar la actividad de estos 16 mutantes purificados, 5 de ellos estarían en el límite de lo que podría considerarse falsos positivos, con lo que el porcentaje final de mutantes con la nueva característica se reduce al 2%. Aún así, este porcentaje de éxito es considerable, teniendo en cuenta los factores probabilísticos que rigen un típico proceso de *screening* en Evolución Dirigida.

Estadísticamente, el número de posibles variantes de una proteína ( $V$ ) que pueden ser creadas por introducción de  $M$  mutaciones simultáneas, sobre  $N$  aminoácidos totales viene dada por la fórmula:

$$V = 19^N \left[ \frac{N}{(N - M) \cdot M} \right]$$

Esto quiere decir que, para una proteína pequeña, con tan solo 10 posiciones susceptibles de ser alteradas y usando sólo 3 combinaciones diferentes de aminoácidos se podrían generar 823.080 posibles mutantes. Como la mayoría



de esas alteraciones serían deletéreas y muy pocas beneficiosas, las probabilidades de localizar una variante positiva para la nueva capacidad buscada depende proporcionalmente de la cantidad de mutantes analizados en el proceso de *screening*. Si extrapolamos estos cálculos a proteínas mayores y con una mayor diversidad de alteraciones en cuanto a los aminoácidos, tal y como sucede con la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, la estadística nos dice que era muy poco probable incluso localizar un mutante positivo con un análisis de tan solo 540 colonias obtenidas en la primera generación de Evolución Dirigida.

Realmente, el alto porcentaje de mutantes positivos fue una sorpresa para nosotros, pues esta primera ronda de Evolución Dirigida se planteó inicialmente como una fase de aprendizaje e implantación de la técnica en el laboratorio. Por esta razón, el primer análisis de mutantes mediante *screening* se realizó sobre una población pequeña, como toma de contacto con el proceso. Entonces ¿a qué se debió el considerable éxito obtenido en el proceso de evolución sobre la DHAK?. Son varios los factores que pudieron influir en que el porcentaje de mutaciones beneficiosas fuera más alto de lo normal:

En primer lugar, el proceso de evolución no se realizó sobre el total de la proteína, sino que se concentró únicamente sobre el dominio-L donde se sitúa el sitio de unión a ATP, manteniendo el resto de la proteína inalterada. Esta estrategia semi-racional pudo influir en un mayor porcentaje de mutaciones beneficiosas, pues las mutaciones se concentraron únicamente en la *región caliente* de la cual depende la actividad a modificar, evitando alteraciones en otras partes de la proteína cuya modificación pudiese afectar a la actividad o estabilidad de la misma. Esta misma filosofía es la que inspira una variación de la técnica de Evolución Dirigida, en la cual no se realiza una mutagénesis al azar convencional sino que se emplea la denominada mutagénesis saturante o *iterative saturation mutagenesis* (ISM), para la que se utiliza mutagénesis al azar pero localizada sobre regiones muy concretas cuya relación con la característica a modificar es previamente conocida. Esta técnica semi-racional ha demostrado niveles de éxito mayores a los procesos normales, reduciendo considerablemente el volumen de mutantes que deben ser analizados mediante

*screening*, aunque tiene la desventaja de que requiere un conocimiento previo de la estructura de la proteína y de las regiones implicadas en determinada actividad (Reetz y Carballeira, 2007; Reetz *et al.*, 2009).

Otro factor que debe tenerse muy en cuenta es que la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es una enzima con promiscuidad catalítica natural, tal y como se demostró durante la caracterización de la enzima. El elevado porcentaje de mutantes positivos obtenidos puede estar relacionado con la plasticidad de los aminoácidos del centro activo o de sus alrededores y, por lo tanto, con la naturaleza promiscua del enzima. Son cada vez más los trabajos que indican la importancia que tienen las actividades promiscuas en los procesos evolutivos, pues las proteínas con esta capacidad poseen una mayor habilidad para modificar sus funciones con un pequeño número de sustituciones aminoacídicas; es decir: tienen una mayor plasticidad (Aharoni *et al.*, 2005b; Yoshikuni *et al.*, 2006; Khersonsky *et al.*, 2006; Tracewell y Arnold, 2009).

Al ser la DHAK de *C. freundii* una enzima naturalmente promiscua posee una mayor plasticidad, y teniendo en cuenta que dicha promiscuidad se sitúa en el sitio de unión a ATP, que también tiene la capacidad de unir FAD y catalizar su ciclación, la plasticidad se concentra precisamente en la región que debe ser alterada para modificar la especificidad hacia el sustrato donador de fosfato, proporcionando a la proteína una mayor capacidad de evolución. Gracias a esta plasticidad, una sola alteración en esta región promiscua es responsable de que el mutante 1H2 sea capaz de fosforilar DHA utilizando poli-P<sub>i</sub> como donador de fosfato, ampliando la especificidad de sustrato con respecto a la enzima natural.

Por lo tanto, el gran éxito obtenido en la primera generación de mutantes puede achacarse a una suma de factores: se utilizó una estrategia semi-razional que concentró el proceso de evolución en la región responsable de la adquisición de la nueva habilidad catalítica, que además posee una mayor plasticidad debido a la promiscuidad catalítica natural de la enzima.

Por otra parte, en este trabajo hemos comprobado que en un proceso de evolución dirigida, la actividad promiscua de la enzima también fue alterada. En el caso de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626, en el que la actividad promiscua

es dependiente del catión divalente empleado como cofactor, es interesante destacar que la actividad ciclasa dependientes de  $Mg^{2+}$  se incrementa significativamente en los tres mutantes estudiados. Esto podría estar motivado por el hecho de haber realizado el *screening* en presencia de este catión. Los mutantes capaces de usar poli- $P_i$  en presencia de  $Mg^{2+}$  (y por tanto, los seleccionados) presentan a su vez una mayor actividad FMN ciclasa con  $Mg^{2+}$  que la proteína nativa. Estos resultados sugieren que los cambios que han posibilitado que el poli- $P_i$  sea sustrato de la enzima también podrían estar implicados en la unión del FAD.

Finalmente, durante los últimos años, la relación entre evolución natural y evolución *in vitro* se ha ido estrechando cada vez más, hasta el punto de que actualmente la Evolución Dirigida no solo es un proceso para la modificación y mejora de enzimas útiles en procesos biocatalíticos, sino que se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos evolutivos naturales que tienen lugar en las enzimas (Peisajovich y Tawfik, 2007; Yuen y Liu, 2007; Gerlt y Babbitt, 2009). Por esta razón, el proceso evolutivo aquí descrito para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 es de gran interés pues, una vez completado y bien caracterizado puede servir como base para conocer su relación con los procesos de promiscuidad enzimática y cómo las enzimas catalíticamente promiscuas pueden ser más susceptibles a la adquisición de nuevas habilidades, gracias a su plasticidad intrínseca.



## MATERIALES Y MÉTODOS.

### MATERIALES

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo fueron: *Escherichia coli* cepas K12 (ATCC 86984), DH5 $\alpha$ , BL21(DE3) (ambas de Promega) y *Citrobacter freundii* cepa CECT 4626.

El plásmido pGEM-T Easy fue adquirido de Promega y los plásmidos pRSET-A y pET-28b(+) fueron suministrados por Novagen.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en PCR fueron adquiridos en Isogen y la EcoTaq ADN-polimerasa en Ecogen. La T4-DNA ligasa fue adquirida en MBI Fermentas, al igual que los patrones de tamaño molecular 1 kb y 50 bp. *DNA Ladders* y las endonucleasas de restricción *Xho*I, *Hind*III, *Adel* y *Nde*I.

La purificación de fragmentos de DNA a partir de bandas de gel de agarosa se realizó con el *kit Perfectprep<sup>®</sup> Gel Cleanup* de Eppendorf. Para la obtención de plásmidos a partir de cultivos bacterianos se utilizó el *kit GenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep* de Sigma.

El reactivo de Bradford y la solución de Acrilamida/Bis-acrilamida 30% (29:1) para analizar muestras de proteínas mediante SDS-PAGE fueron adquiridos en Bio-Rad, y el patrón de pesos moleculares *Low Molecular Weight Calibration Kit* en GE Healthcare.

Las enzimas  $\alpha$ -GDH, TIM, PK, LDH, AK y RAMA fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. La lisozima fue adquirida a USB Corporation y la DNasa I a Roche. El

IPTG y el imidazol fueron suministrados por Acros Organics. Los antibióticos estreptomicina sulfato, kanamicina sulfato y ampicilina, el ATP, el acetil-fosfato, el NADH, el FAD, los distintos aldehidos y el resto de reactivos de rutina utilizados en esta memoria fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

Las enzimas Fuc-1PA y Rha-1PA de *E. coli* fueron clonadas en nuestro laboratorio por lo que disponíamos de ellas (Iturrate, 2008).

Las membranas de diálisis Spectra/Por<sup>®</sup>, adecuadas para la diálisis de proteínas de peso molecular superior 12000-14000 Da, son de la marca Spectrum.

Los componentes de los distintos medios de cultivo (extracto de levadura, tristona y agar bacteriológico), al igual que la agarosa D-1 Medium EEO, fueron adquiridos a Pronadisa.

La amplificación de ADN se hizo en un *Mastercycler Personal* de Eppendorf. Los geles de agarosa para electroforesis de DNA se resolvieron en una cubeta *RunOne<sup>TM</sup> Electrophoresis Cell* de EmbiTec. Los geles de acrilamida/bisacrilamida para SDS-PAGE y tricina-SDS-PAGE se resolvieron en una cubeta *MiniProtean<sup>®</sup> 3* de Bio-Rad. El análisis densitométrico de los geles de agarosa y de acrilamida se realizó en un fotodocumentador *Gene Flash Bio Imaging* de Syngene LTD con el programa GeneTools 3.07.

Los cultivos celulares se incubaron en un agitador orbitálico termostatzado *Lab-Shaker* de Adolf Kühner AG.

La resina de Ni<sup>+2</sup>-IDA-agarosa de alta capacidad (35-40  $\mu$ mol Ni<sup>+2</sup>/ml resina; IDA = ácido iminodiacético) fue suministrada por Agarose Bead Technologies (ABT). Las columnas cromatográficas Glass Econo-Column<sup>®</sup> ( $\varnothing$ =2,5 cm) para la purificación de proteína se adquirieron en Bio-Rad. Para la purificación de proteínas se utilizaron columnas de exclusión molecular HiLoad 26/60 Superdex 75 y 200 PG, controladas por un sistema *AKTA-FPLC* de GE Healthcare Life Science. Las muestras de proteína pura se liofilizaron en un liofilizador *Lioalfa 6* de Telstar.

Los ensayos espectrofotométricos se realizaron en un espectrofotómetro UV-

Visible *SPECTRAmax-384 PLUS*, de Molecular Devices. Las reacciones de ciclación y fosforilación se analizaron en un HPLC Jasco PU-2089 Plus con un detector de absorbancia Jasco UV-2075 Plus.

Para la cromatografía de capa fina (TLC) se usaron placas de gel de sílice 60F<sub>254</sub> (MERK). Como fase móvil se empleó una mezcla etanol-amoniaco (2,5/3,0 v/v) y las placas se revelaron con Ce<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.

## MÉTODOS

Las técnicas básicas de manipulación de ADN, PCR, clonaje, ligamiento, preparación de células competentes, transformación, preparación de medios de cultivo, etc., se realizaron según se describen en Sambrook *et al.*, 1989.

Los distintos fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio (0,4 µg/ml), y la secuenciación de los diferentes genes se realizó en el Centro de Secuenciación de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

### Obtención de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.

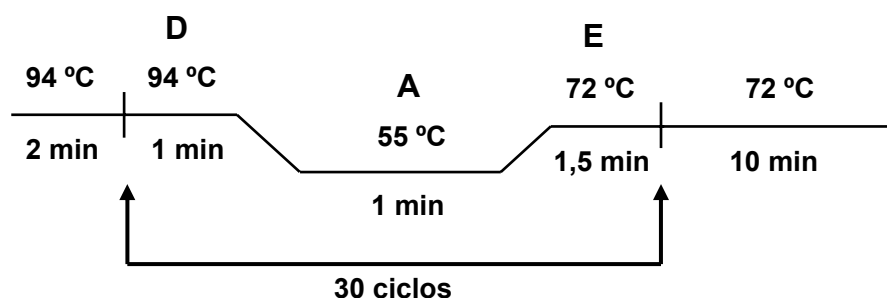
#### Amplificación del gen *dhak* de *C. freundii*.

El ADN molde se obtuvo lisando 15 µl de un cultivo O/N de la cepa CECT 4626 de *C. freundii* con 35 µl de *Colony Lysis Buffer* (Tris-HCl 20 mM, 1% Tritón X-100, EDTA 2 mM, pH 8,5). La amplificación por PCR se realizó empleando oligonucleótidos cebadores específicos, cuyo diseño se basó en el gen *dhak* presente en la cepa DMS 30040 de *C. freundii* (GeneBank Accession N° U09771). La secuencia de los oligonucleótidos específicos diseñados se muestra en la Tabla 1M.

**Tabla 1M.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *dhak*.

Extremo	Diana	Oligonucleótido
N-terminal	<i>Xho</i> I	5'-TATAACTCGAGATGTCTCAATTCTTT-3'
C-terminal	<i>Hind</i> III	5'-TTCTAAAGCTTTTAGCCCAGCTCACT-3'

La amplificación del gen *dhak* se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l mediante 30 ciclos de temperatura. Cada reacción contenía: 3  $\mu$ l del lisado celular, 10  $\mu$ l Buffer 10x (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (200  $\mu$ M), *Taq* polimerasa (2,5 U), oligonucleótidos cebadores específicos (1  $\mu$ M). Los ciclos de temperatura utilizados se encuentran recogidos en la Figura 1M.



**Figura 1M.** Ciclo de amplificación del gen *dhak*. **D**: desnaturalización, **A**: anillamiento, **E**: elongación.

### Clonaje del gen *dhak* de *C. freundii*.

Como vector de expresión se seleccionó el pRSET-A, de 2.900 pb, que es un plásmido de alto número de copia, que introduce resistencia al antibiótico ampicilina, cuyo promotor proporciona altos niveles de expresión de proteína y que además la expresa fusionada a un pequeño péptido en el extremo N-terminal que contiene seis histidinas. Esta cola de histidinas presenta alta afinidad por cationes divalentes, facilitando la purificación de la proteína a partir del extracto soluble de lisados celulares mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC).



Tanto el inserto purificado procedente de la PCR (1.659 pb) como el plásmido pRSET-A se sometieron a una doble digestión con los enzimas de restricción *HindIII* (200 U) y *XhoI* (200 U) en un volumen de reacción de 100 µl según el protocolo estándar del fabricante. Tras la purificación, se procedió al ligamiento del inserto *dhak* en el vector doblemente digerido en pRSET-A, con una relación vector/inserto de 1/3, usando DNA T4 ligasa y una concentración 1 mM de ATP. La construcción resultante pRSET-*dhak* se utilizó para transformar células competentes BL21(DE3) que fueron crecidas sobre placas de LB-agar, conteniendo 250 µg/ml de ampicilina. De las colonias que crecieron en estas condiciones se seleccionaron 10 al azar y se chequearon mediante PCR. Seis de las colonias positivas se crecieron en 5 ml de LB-ampicilina para la purificación de sus plásmidos, a partir de los cuales se obtuvo la secuencia completa del gen *dhak* usando el cebador de secuenciación del promotor de la T7-DNA polimerasa.

### Sobre-expresión de la enzima DHAK de *C. freundii*.

Para la sobre-expresión de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se seleccionó una de las colonias positivas que contenía el gen *dhak*. El clon de pRSET-*dhak*/BL21 se creció en medio LB conteniendo 250 µg/ml de ampicilina a 37 °C hasta una O.D.<sub>600 nm</sub>~0.5. En ese momento la expresión se indujo con IPTG 0,4 mM y el cultivo se mantuvo O/N a 30 °C. Para la extracción de las proteínas los cultivos se centrifugaron a 3.000 xg durante 30 min a 4 °C y las células se sometieron a tratamiento con lisozima. (Bastida *et al.*, 2001) Para ello, las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (8 ml/g de células) y se añadieron 2 mg de lisozima por cada gramo de células, en EDTA 50 mM pH 8,2. La suspensión se agitó intensamente a temperatura ambiente durante 1 hora y después se mantuvo en agitación O/N a 4 °C. A la solución viscosa resultante se le añadieron 10 µg DNasa I por gramo de células y MgCl<sub>2</sub> 0,95 µg/ml, y se agitó a 4 °C durante 30 min. Esta mezcla se centrifugó durante 30 min a 13.000 x g para separar el extracto crudo de proteínas solubles (CFE) de los precipitados y cuerpos de inclusión. A continuación, se añadió un 1% de

estreptomycin sulfato al sobrenadante y se agitó durante 20 min a 4°C. La mezcla se centrifugó a 4°C durante 30 min a 13.000 r.p.m. para obtener el CFE libre de ácidos nucleicos. El nivel de expresión se analizó mediante SDS-PAGE en geles al 10% así como mediante valoración de la actividad y de la concentración de proteína.

### Purificación de la enzima DHAK de *C. freundii*.

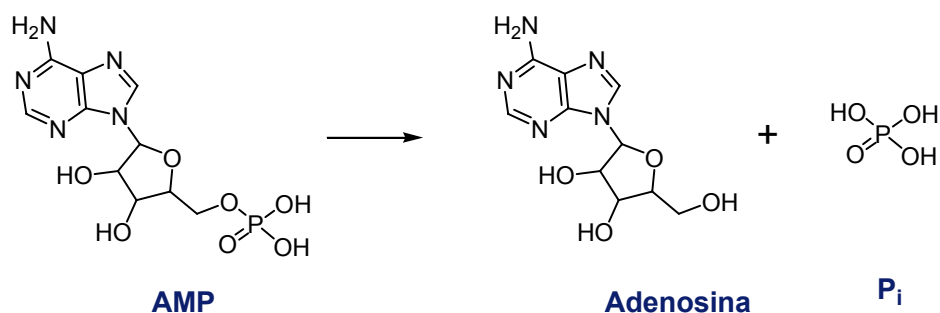
El primer paso de purificación se realizó mediante IMAC con resina de Ni<sup>2+</sup>-IDA-agarosa de alta densidad. Para la purificación a partir de CFE, la resina lavada y equilibrada en tampón fosfato 20 mM pH 7,5 se empaquetó en la columna cromatográfica ( $\varnothing = 2,5$  cm;  $h = 1,0$  cm), y se añadió un volumen de fracción soluble de proteínas igual al volumen de resina. Una vez cargada la fracción soluble, la resina se lavó con 3 volúmenes de tampón fosfato 20 mM pH 7,5 con el fin de eliminar aquellas proteínas unidas inespecíficamente. A continuación, la proteína recombinante se eluyó empleando 3 volúmenes de imidazol 0,25 M en tampón fosfato 20 mM a pH 7,5. Todas las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE en geles del 10%, así como mediante valoración de la actividad y de la concentración de proteína.

Para la utilización directa de la proteína purificada mediante IMAC, los eluidos obtenidos fueron dializados frente a H<sub>2</sub>O mili-Q a pH 7,5 para la completa eliminación del imidazol, pues este compuesto interfiere con la actividad de la DHAK al ser un quelante del cofactor Mg<sup>2+</sup>, imprescindible para la actividad enzimática. Los dializados libres de imidazol fueron liofilizados en alícuotas de ~5ml para su posterior uso. No obstante, este protocolo para la purificación de la DHAK solo se utilizó de forma independiente en casos excepcionales, en los cuales la contaminación por TIM en el purificado final no era incompatible con el ensayo utilizado.

Para un mayor grado de pureza y la completa eliminación de contaminación por TIM fue necesario un segundo paso de cromatografía por exclusión molecular, siguiendo a la cromatografía de afinidad inicial. De esta forma, la combinación de ambos procesos se estableció como protocolo estándar para la

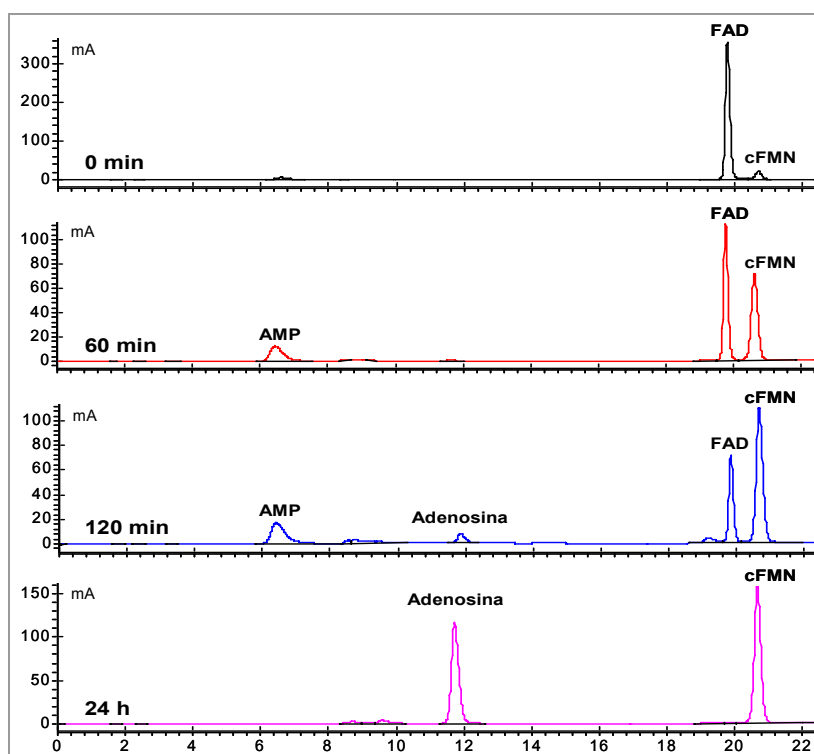
purificación de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Para el segundo paso de exclusión molecular se utilizaron directamente los eluidos obtenidos mediante IMAC, puesto que la presencia de imidazol no era inconveniente para la posterior separación de la proteína. La columna de exclusión molecular utilizada fue una HiLoad 26/60 Superdex 75 PG, controlada mediante FPLC. La fase móvil empleada fue tampón fosfato 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,2 con un flujo isocrático de 1,0 ml/min. Las fracciones que contenían la DHAK (analizadas mediante SDS-PAGE y ensayo de actividad quinasa) fueron mezcladas para su diálisis frente a agua mili-Q a pH 7,5 y su posterior liofilizado alícuotas de ~5ml.

A pesar de que el grado de pureza alcanzado con el protocolo estándar (IMAC + un paso de exclusión molecular) fue elevado y permitió eliminar la contaminación por TIM, se comprobó que no era suficiente para la caracterización de procesos relacionados con la actividad promiscua ciclasa. Un análisis detallado las reacciones FMN-ciclasa catalizadas por la DHAK purificada según el protocolo estándar indicó la existencia de una actividad AMP 5'-nucleotidasa en el medio de reacción, probablemente debida a contaminación enzimática (Figura 2M).



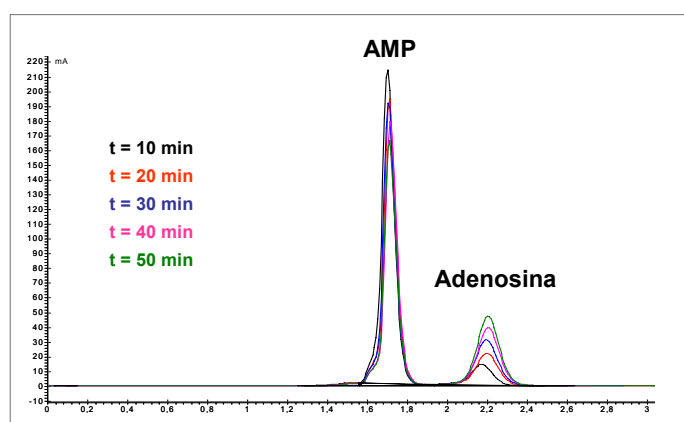
**Figura 2M.** Esquema de la actividad AMP 5'-nucleotidasa.

Cuando el tiempo de incubación se prolongaba en estas reacciones, si bien inicialmente sólo se formaban cFMN y AMP como productos de reacción, a tiempos más largos aparecían cantidades crecientes de adenosina, y en paralelo el AMP inicialmente generado desaparecía (Figura 3M), lo cual indicaba claramente la presencia de una actividad 5'-nucleotidasa.



**Figura 3M.** Cromatogramas de HPLC (Met-2) obtenidos a tiempos crecientes de una reacción de ciclación catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en presencia de FAD y  $\text{Mn}^{2+}$ .

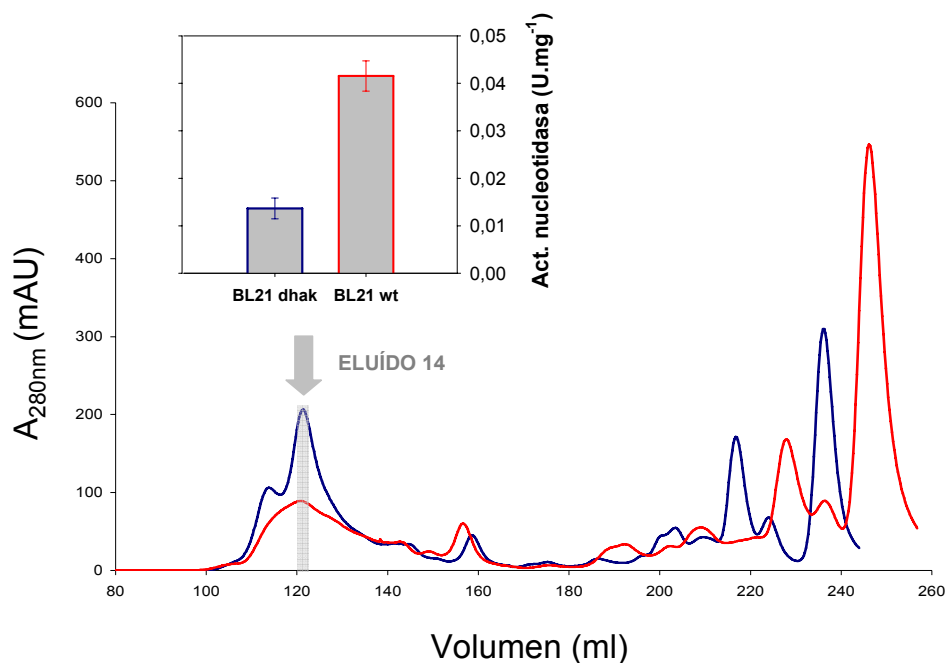
La presencia de actividad nucleotidasa fue posteriormente confirmada mediante incubación del purificado estándar de DHAK en presencia de AMP y  $\text{Mn}^{2+}$ , mostrando la aparición de un pico correspondiente a la adenosina (Figura 4M). Este nuevo pico fue asignado a la adenosina inequívocamente mediante el uso de patrones comerciales y análisis por ESI-MS.



**Figura 4M.** Cromatogramas de HPLC (Met-1) obtenidos a tiempos crecientes de una reacción 5'-nucleotidasa catalizada por la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 en presencia de AMP y  $\text{Mn}^{2+}$ .

Al comparar el perfil de elución de la DHAK con el de actividad nucleotidasa durante el purificado de exclusión molecular se observó que ambas se co-purificaban en fracciones de elución similares, aunque su proporción y distribución no era constante y variaba ligeramente en purificaciones consecutivas. Este hecho reforzaba la hipótesis de la contaminación enzimática.

Por esta razón se realizó un ensayo control sobre las actividades de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. Para este ensayo se prepararon en paralelo dos cultivos de dos cepas distintas de BL21 (DE3): la cepa nativa y la transformada con el gen *dhak* de *C. freundii* CECT 4626, que es la cepa empleada habitualmente para la obtención de la DHAK recombinante. Ambos cultivos fueron inducidos con IPTG, aunque evidentemente la DHAK sólo se expresó en la cepa transformada. A partir de los cultivos finales se obtuvieron las correspondientes fracciones solubles. En el paso de exclusión molecular, se recogieron exactamente las mismas fracciones en el proceso iniciado con los dos extractos crudos, para analizar la distribución y magnitud de las actividades quinasa, ciclasa y nucleotidasa (Figura 5M).



**Figura 5M.** Cromatograma de la purificación mediante exclusión molecular a partir de extractos solubles procedentes de BL21 (DE3) sin transformar (—) y transformada (—). El inserto muestra la actividad específica nucleotidasa en la fracción 14, cuya localización en el cromatograma se señala en gris.

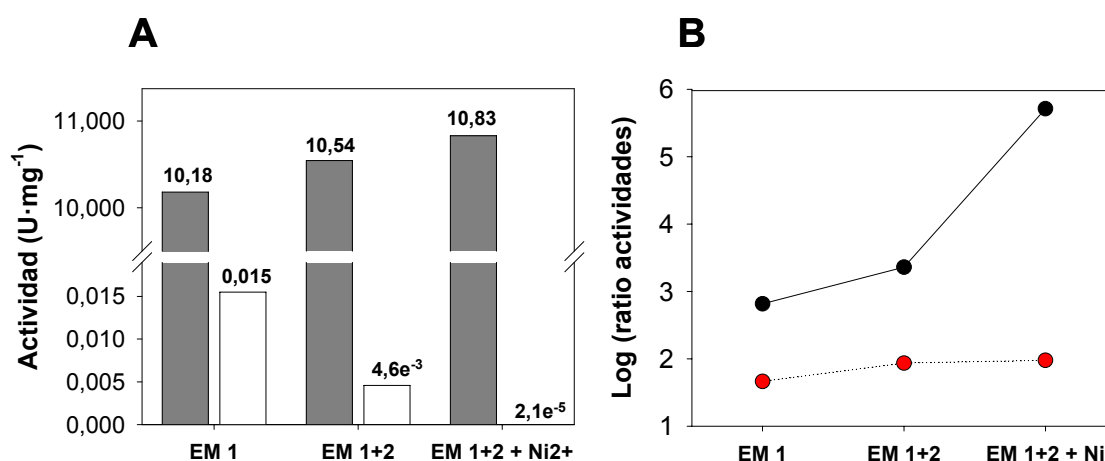
Los resultados indicaron que, en aquella fracción donde la actividad quinasa es mayor (la fracción 14, la cual coincide con el máximo de absorbancia a 280 nm en el cromatograma de elución de proteína) la actividad nucleotidasa es mucho menor para la purificación a partir de la cepa transformada que para la purificación obtenida a partir de la cepa nativa. Este resultado indica claramente que la actividad nucleotidasa se debe a otra enzima, propia de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, y que se co-purifica con la DHAK recombinante, debido a que sus perfiles de elución son coincidentes. Por esa razón, al purificar esas fracciones en la cepa nativa se obtiene una actividad nucleotidasa tres veces mayor, puesto que al no existir expresión de DHAK estas fracciones se enriquecen enormemente con la proteína nativa de *E. coli* BL21 (DE3), incrementando considerablemente la actividad nucleotidasa de la fracción. Por el contrario, en la fracción 14 obtenida a partir de la cepa BL21 (DE3) nativa, la actividad ciclase es nula, lo cual confirma que se trata de una actividad promiscua intrínseca a la propia DHAK, y no un resultado de contaminación enzimática.

Con estos ensayos se demostró que con el sistema habitual de purificación, si bien no ofrece ningún problema para el manejo y caracterización de la actividad quinasa (en las fracciones purificadas es unas 750 veces superior a la actividad nucleotidasa contaminante), si que puede ser un problema para el estudio de la actividad ciclase, en el caso de realizar ensayos de larga duración, puesto que se puede formar adenosina en lugar de AMP. Por esta razón, se diseñó un método alternativo de purificación para eliminar completamente la actividad nucleotidasa. Para este nuevo protocolo de purificación se emplearon dos pasos consecutivos de cromatografía de exclusión molecular, incorporando una segunda columna HiLoad 26/60 Superdex 200 PG con un menor tamaño de poro y, por lo tanto, una mayor resolución de las proteínas purificadas.

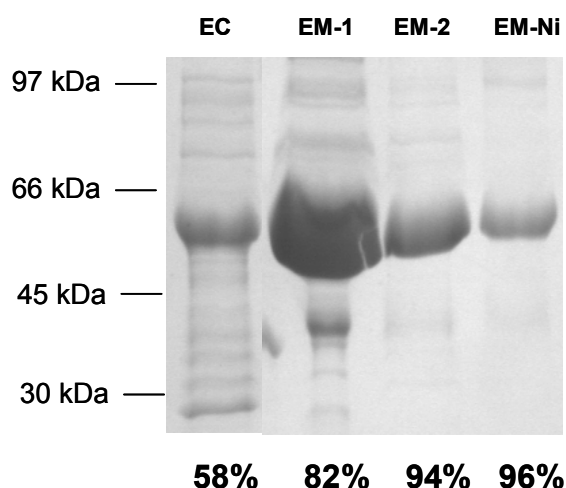
A diferencia del protocolo estándar, no solo se realizaron dos pasos de exclusión en vez de uno, sino que la cromatografía de afinidad se realizó después de la de exclusión molecular, con el fin de evitar la interferencia que pudiese producir sobre este paso la presencia de altas concentraciones de proteínas, minimizando las interacciones inespecíficas con la resina. El

seguimiento de la purificación se realizó mediante tricina-SDS-PAGE (Schägger, 2006), pues su mayor resolución con respecto al habitual SDS-PAGE permite obtener una mayor información sobre las posibles impurezas co-purificadas en el proceso.

El análisis de las fracciones obtenidas en cada paso de purificación mostró un enriquecimiento en las actividades quinasa y ciclasa, mientras que la actividad nucleotidasa desapareció progresivamente, hasta ser prácticamente nula en el purificado final (Figura 6M). Además se observó que las actividades quinasa y ciclasa seguían una correlación lineal, indicando una co-purificación de ambas actividades, mientras que la correlación quinasa-nucleotidasa aumentó con los pasos de purificación, confirmando que no se trataba de una actividad intrínseca de la DHAK recombinante (Figura 6M-B). También el análisis mediante tricina-SDS-PAGE indicó claramente cómo el grado de pureza se incrementó progresivamente, alcanzando grados de pureza mayores que con el protocolo inicial de purificación: 96% en gel de tricina, determinado mediante densitometría (Figura 7M). Una vez demostrada la validez de este nuevo método de purificación en la eliminación de nucleotidasas contaminantes, se empleó para la obtención de DHAK aplicable a ensayos de caracterización de la actividad promiscua FMN-ciclasa.



**Figura 6M.** Análisis de la purificación de DHAK mediante valoración de actividades. **A:** actividades quinasa (■) y nucleotidasa (□) valoradas en cada paso de purificación; primera exclusión molecular (EM 1), segunda exclusión molecular (EM 1+2) y exclusión molecular seguida de IMAC (EM 1+2 + Ni<sup>2+</sup>). **B:** correlación de actividades quinasa-ciclasa (●) y quinasa-nucleotidasa (●) observada en los diferentes pasos de purificación.



**Figura 7M.** Análisis de la purificación de DHAK variante mediante tricina-SDS-PAGE. **EC:** fracción soluble antes de la purificación; **EM-1:** primer paso de exclusión molecular; **EM-2:** segundo paso de exclusión molecular; **EM-Ni:** dos exclusiones moleculares más IMAC. En la parte inferior se muestra el porcentaje de DHAK (63 kDa) con respecto al total de proteína, detectada mediante densitometría.

## Análisis de proteína.

### Estudio de aminoácidos.

Para el análisis de aminoácidos se utilizó una fracción de DHAK purificada al máximo nivel, que fue dializada frente a H<sub>2</sub>O mili-Q a pH 7,5 pero no liofilizada. Para la estimación de la concentración de la muestra se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico para la DHAK de  $39970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

El análisis de aminoácidos se realizó por triplicado en el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) en un analizador Biochrom 20 (Farmacia). La cuantificación exacta de la concentración de proteína en la muestra analizada permitió calcular el coeficiente de extinción molar experimental para la DHAK a 280 nm, valorando la absorbancia a esta longitud de onda a concentraciones crecientes de DHAK ( $\epsilon^{280} = 35599 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

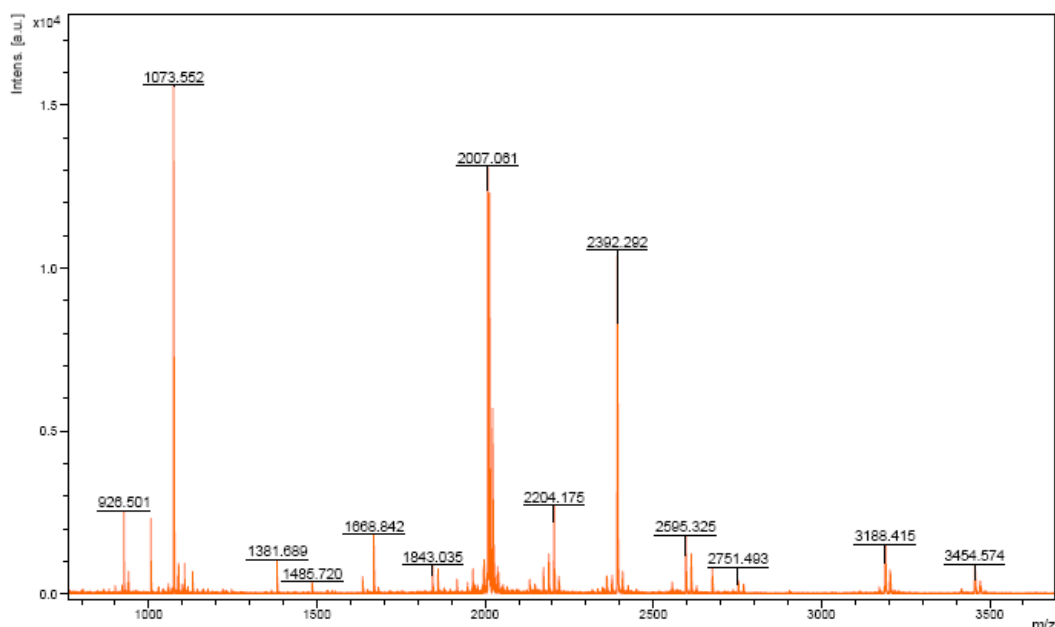


### Determinación de la concentración de proteína.

En el caso mezclas de proteína, por ejemplo en CFE, la concentración total se valoró con el reactivo de Bradford, utilizando una absorbancia de 595 nm (Bradford, 1976). En muestras de proteína pura y conocido el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon^{280}$ ) de la DHAK a partir del análisis de aminoácidos, la concentración de proteína fue calculada a partir de la ecuación de Lambert-Beer ( $Abs = C \cdot \epsilon \cdot L$ ) que relaciona concentración con absorbancia.

### Determinación de la huella peptídica de la DHAK de *C. freundii*.

Como herramienta de identificación de la proteína, se realizó un análisis de la huella peptídica a partir de la banda correspondiente al monómero de DHAK, obtenida mediante SDS-PAGE, en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). La muestra se digirió con tripsina a 37 °C durante una noche. La huella peptídica se genera por análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF en el rango  $m/z$  =800-3600 de los péptidos generados tras la digestión del enzima (Figura 8M). La comparación de la secuencia de estos péptidos con las bases de datos fue realizada con el programa MASCOT. (Perkins *et al.*, 1999).



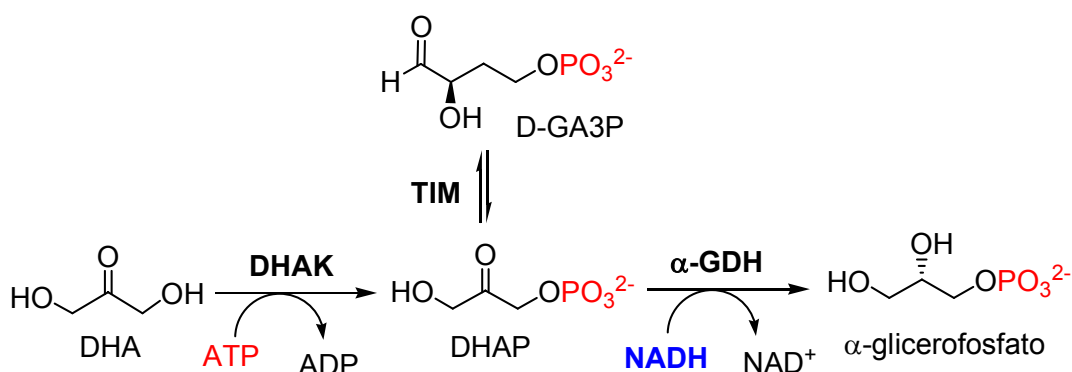
**Figura 8M.** Cromatograma de la huella peptídica de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.

## Análisis de la actividad enzimática.

### Ensayos de actividad quinasa.

#### **Ensayo enzimático $\alpha$ -GDH/TIM**

La fosforilación de DHA se valoró espectofotométricamente mediante un ensayo enzimático acoplado, basado en la reducción catalizada por la  $\alpha$ -GDH de la DHAP formada a  $\alpha$ -glicerofosfato, con oxidación concomitante de NADH a  $\text{NAD}^+$  (Figura 9M). Los ensayos enzimáticos se realizaron a 25 °C ó 37 °C, siguiendo el descenso de absorbancia a 340nm ( $\epsilon_{\text{NADH}}^{340} = 6220 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ) durante tiempos de entre 10 y 20 minutos, en mezclas de reacción de 1 ml que contenían: Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), DHA (2,5  $\mu\text{moles}$ ), NADH (0,2  $\mu\text{moles}$ ), ATP (5,0  $\mu\text{moles}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (5,0  $\mu\text{moles}$ ),  $\alpha$ -GDH (1,26 U), TIM (12,6 U) y DHAK (previa valoración de la cantidad de enzima para el cálculo de actividad específica). La cantidad de enzima que puede utilizarse en este tipo de ensayos es muy variable pues se requieren pendientes observables pero no demasiado pronunciadas para una correcta valoración de la actividad. Esto permite una cierta optimización de la cantidad añadida en función de las condiciones y necesidades de cada ensayo. Una unidad (U) de actividad quinasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1  $\mu\text{mol}$  de DHAP por minuto, bajo las condiciones especificadas.



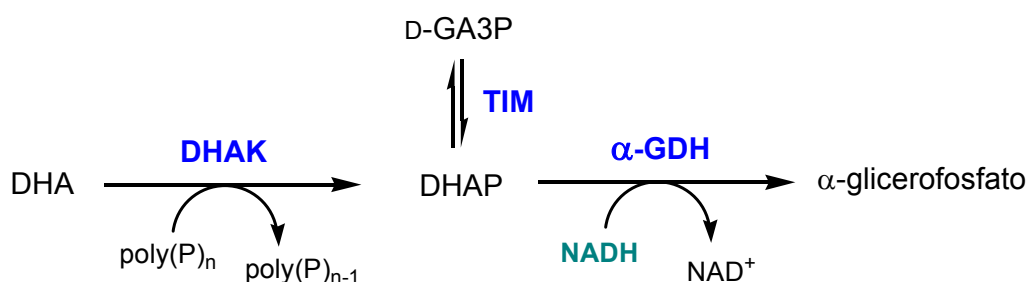
**Figura 9M.** Ensayo enzimático de actividad quinasa basado en la mezcla  $\alpha$ -GDH/TIM.

En la evaluación de diferentes donadores de fosfato como sustratos de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 los ensayos de actividad se realizaron a tres concentraciones finales distintas de donador: 5 mM (concentración similar a la utilizada normalmente con el sustrato natural ATP), 0,25 mM y 15 mM, utilizando excesos de  $\text{Mg}^{2+}$  de entre 10 mM y 30 mM.

Con la mezcla enzimática  $\alpha$ -GDH/TIM también fue posible valorar la actividad de la DHAK en la fosforilación de D-GA. Con este ensayo se puede medir espectrofotométricamente el D-GA3P formado en la reacción, puesto que la TIM cataliza su epimerización a DHAP, cuya formación es valorada mediante la  $\alpha$ -GDH (Figura 9M). Las condiciones de reacción son idénticas a las especificadas para evaluar la actividad con DHA, pero empleando una concentración de D-GA de 5 mM.

### ***Ensayo enzimático como método de screening en Evolución Dirigida***

En cuanto al tipo de ensayo de actividad quinasa empleado durante el proceso de *screening* en Evolución Dirigida, es una variante del método descrito anteriormente. La principal modificación es la que conlleva la introducción de los factores de selección: poli- $\text{P}_i$  en alta concentración como sustrato donador de fosfato (Figura 10M).



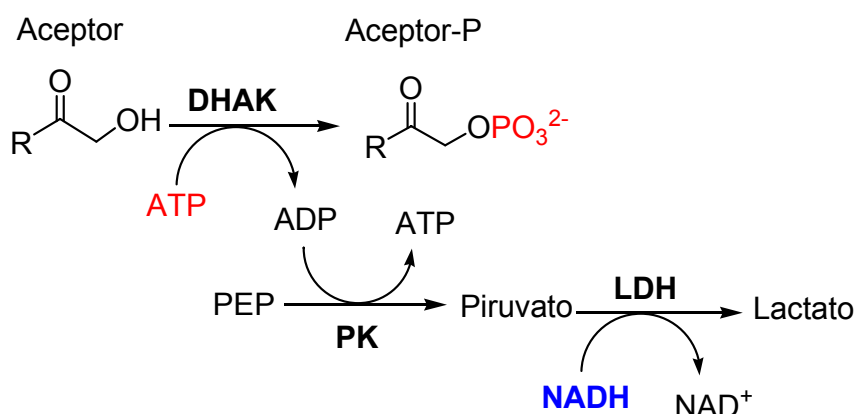
**Figura 9M.** Ensayo enzimático de actividad con poli- $\text{P}_i$  basado en la mezcla  $\alpha$ -GDH/TIM.

Los ensayos se realizaron en placas de 96-pocillos, con un volumen final por reacción de 0,3 ml conteniendo: Tris-HCl (40 mM pH 8,0), NADH (0,2  $\mu\text{M}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (2,5  $\mu\text{M}$ ), DHA (2,5  $\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -GDH (7,8 U/ml), poli- $\text{P}_i$  (150  $\mu\text{M}$ ), se emplearon 15  $\mu\text{l}$  extracto crudo obtenido con cada uno de los mutantes. Se midió en primer lugar durante 10 minutos la oxidación inespecífica de NADH en

ausencia de DHA, tras los cuales se adicionó el sustrato para iniciar el ensayo de fosforilación en presencia de poli- $P_i$ . El ensayo de actividad en presencia de poli- $P_i$  utilizado para los mutantes purificados fue similar al descrito pero escalado a volúmenes de 1 ml (reacción en cubeta), y utilizando cantidades conocidas de cada enzima variante para el cálculo de la actividad específica.

### Ensayo enzimático PK/LDH

Para el estudio de otros aceptores diferentes a DHA como sustratos de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 se utilizó otro ensayo enzimático acoplado, basado en la valoración de ADP generado durante la fosforilación. Este ensayo requiere la enzima PK, que transfiere un grupo fosfato desde el fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP generado durante la fosforilación, regenerando el ATP inicial. En el proceso se forma ácido pirúvico que se reduce a ácido láctico por mediación de la LDH, con oxidación simultánea de NADH a  $NAD^+$  (Figura 11M). Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas para la  $\alpha$ -GDH y cada mezcla de reacción de 1 ml contenía: Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), sustrato aceptor de fosfato (2,5  $\mu$ moles), NADH (0,2  $\mu$ moles), ATP (5,0  $\mu$ moles), PEP (5,0  $\mu$ moles),  $MgSO_4$  (5,0  $\mu$ moles), PK (1,4 U), LDH (5,0 U) y DHAK (previa valoración de la cantidad de enzima para el cálculo de actividad específica).



**Figura 11M.** Ensayo enzimático de actividad quinasa basado en la mezcla PK/LDH.

En la evaluación de diferentes aceptores se emplearon concentraciones

finales entre 0,1 mM y 5,0 mM en diferentes ensayos, siendo necesario la utilización de 20% v/v de DMSO o DMF como co-disolventes con los compuestos 2-hidroxiacetofenona y N-(hidroximetil)-phtalamida, debido a su baja solubilidad en agua. Una unidad (U) de actividad quinasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1  $\mu$ mol de DHAP por minuto, bajo las condiciones especificadas.

Con la mezcla enzimática PK/LDH también fue posible valorar la actividad de la DHAK en la fosforilación de D,L-GA. Las condiciones de reacción son idénticas a las especificadas para evaluar la actividad con DHA, pero empleando una concentración de D,L-GA de 5 mM.

### ***Ensayo de actividad para el cálculo del pH óptimo***

Se evaluó en varias reacciones de fosforilación mediadas por la DHAK variando el pH del medio de reacción. Cada reacción contenían, en un volumen final de 3 ml: DHAK (0,15 mg), DHA (0,1 mmoles),  $MgSO_4$  (0,25  $\mu$ moles), ATP (70  $\mu$ moles) y tampón HEPES (20 mM) a diferentes valores de pH entre 6,0 y 7,25. Para reacciones a valores de pH más ácido (5,0 y 5,5) se empleó tampón citrato sódico (20 mM). Se empleó una concentración 0,025 mM de ATP (por debajo de la concentración inhibitoria) sin sistema de regeneración de ATP, para no incluir más enzimas, susceptibles a la variación de pH, que habrían alterado los resultados finales. Se tomaron alícuotas de reacción a distintos tiempos en los cuales se valoró la aparición del producto DHAP mediante ensayo espectrofotométrico basado en la mezcla enzimática  $\alpha$ -GDH/TIM. La velocidad de aparición del sustrato DHAP en función del tiempo es proporcional a la actividad DHAK a un determinado pH.

### ***Evaluación de la fosforilación mediante HPLC***

La actividad quinasa también puede evaluarse mediante detección del ATP consumido y el ADP formado durante el proceso de fosforilación, tanto de la DHA como de cualquier otro sustrato aceptor no natural. El requisito indispensable para este tipo de ensayo de actividad es la necesidad de utilizar concentraciones iniciales bajas de ATP y trabajar a tiempos cortos de reacción.

De lo contrario el ADP se acumularía en el medio y se produciría inhibición de la DHAK. Este tipo de ensayo de actividad se utilizó para confirmar la capacidad de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 para fosforilar gliceraldehído e hidroxiacetona, en reacciones de 3 ml conteniendo: DHAK (1 mg), MgSO<sub>4</sub> (25 μmoles), ATP (12 μmoles), tampón HEPES (20 mM) y sustrato aceptor de fosfato (0,2 mmoles). Para el análisis mediante HPLC se utilizó una columna C18 *Inertsil* ODS-2 (cm x 0,46, Ø=5 μm; Sciences Inc.) protegida mediante pre-columna del mismo material. Se utilizó tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM pH 6,0 con flujo isocrático 1,0 ml/min y detección a 260 nm, el máximo de absorción para nucleótidos. Este método permitió separar y cuantificar ATP (tiempo de retención 3,8 min) y ADP (tiempo de retención 4,6 min), lo cual posibilita la valoración de la actividad quinasa. Una unidad (U) de actividad quinasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1 μmol de DHAP por minuto, bajo las condiciones especificadas.

### Ensayos de actividad FMN-ciclasa.

La actividad FMN-ciclasa fue determinada mediante valoración del cFMN formado a partir de FAD mediante detección del producto por HPLC ( $\epsilon_{cFMN}^{430} = 11300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Cada reacción de 1 ml contenía: Tris-HCl (40 mM, pH 7,5), MnCl<sub>2</sub> (12 μmoles), FAD (0.25 μmoles) y DHAK (previa valoración de la cantidad de enzima para el cálculo de actividad específica). Las mezclas finales de reacción fueron incubadas 60 minutos, a temperaturas de 25 °C ó 37 °C. Las reacciones realizadas a 37 °C requirieron una pre-incubación de 10 minutos a la temperatura de reacción antes de la adición del sustrato FAD. Una unidad (U) de actividad FMN-ciclasa se define como la cantidad de enzima que es capaz de producir 1 μmol de cFMN por minuto, bajo las condiciones especificadas.

Para el análisis por HPLC se utilizaron dos clases de columnas bastante similares (ambas tipo C18): la C18 *Inertsil* ODS-2 (15 cm x 0,46, Ø=5 μm; Sciences Inc.) y la *Mediterranea sea*<sub>18</sub> (25 cm x 0,46, Ø=5 μm; Tecknokroma), protegidas mediante pre-columnas del mismo material. También se utilizaron dos tipos de métodos para diferentes análisis:

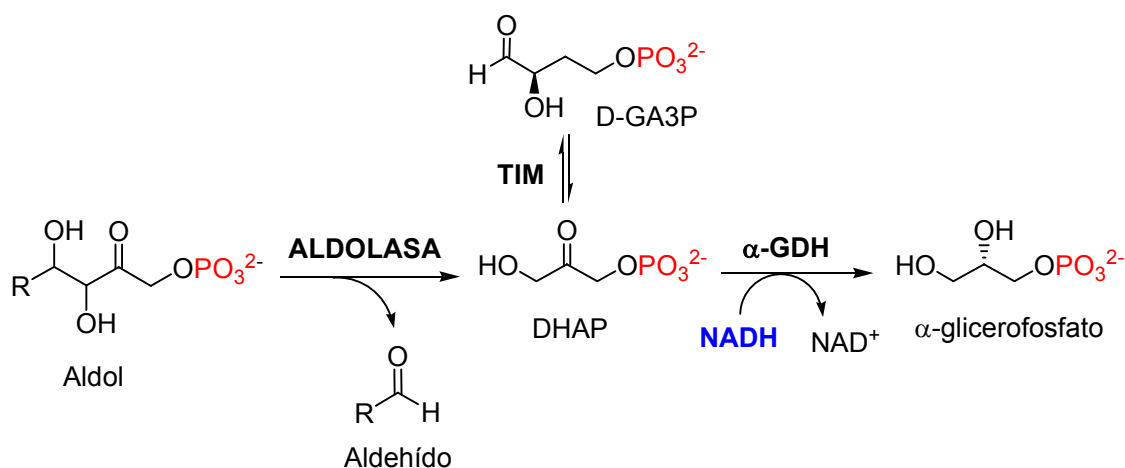
- **Método 1:** La fase móvil empleada fue tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM pH 6,0 y metanol con una concentración final del 35% v/v. Se utilizó flujo isocrático 1,0 ml/min con detección del cFMN a 430 nm. Este método permitió separar y cuantificar FAD (tiempo de retención 1,8 min) y cFMN (tiempo de retención 2,45 min).

- **Método 2:** tampón A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM pH 6.0, tampón B: metanol; 0-10 min 100% A isocrático; 10-11 min gradiente lineal hasta 65% A y 35% B; 11-17 min 65% A y 35% B isocrático; 17-18 min gradiente lineal hasta 100% A, 18-30 min 100% A isocrático. Detección a 430 nm. Este método permitió identificar FAD (tiempo de retención 19,8 min) y cFMN (tiempo de retención 20,7 min).

Modificando la longitud de onda del detector desde 430 nm hasta 260 nm estos dos métodos de HPLC también fueron utilizados para evaluar la actividad contaminante nucleotidasa, presente en los purificados iniciales de DHAK. Con detección a 260 nm, además de detectar el FAD y cFMN a los tiempos de retención anteriormente especificados, también es posible observar los picos correspondientes a adenosina (tiempos de retención de 2,2 min con el Método 1 y 11,8 min con el método 2) y AMP (solo con el Método 2, con un tiempo de retención de 6,4 minutos).

### Ensayos de actividad aldolasa.

La actividad aldolasa se evaluó mediante valoración espectofotométrica de la DHAP formada durante la catálisis de la reacción retro-aldólica, catalizada por RAMA, Fuc-1PA o Rha-1PA. El ensayo enzimático acoplado que se utilizó para la valoración de DHAP fue el mismo previamente descrito para la evaluación de la actividad quinasa con la mezcla enzimática  $\alpha$ -GDH/TIM (Figura 12M).



**Figura 12M.** Ensayo enzimático de actividad aldolasa mediante valoración de la DHAP formada en la reacción retroaldólica con  $\alpha$ -GDH/TIM.

Las valoraciones de actividad se realizaron a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 ml. La mezcla de reacción contenía una cantidad conocida de aldolasa (RAMA, Rha-1PA o Fuc-1PA), en tampón Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), con NADH (0,2  $\mu$ moles),  $\alpha$ -GDH (1,26 U), TIM (12,6 U) y el sustrato correspondiente a cada aldolasa: FBP, Rha-1P o Fuc-1P (1  $\mu$ mol). Para los ensayos de actividad de las aldolasas de clase II (Rha-1PA y Fuc-1PA) también se añadió  $ZnCl_2$  (0,015  $\mu$ moles). Se define 1 unidad de actividad aldolasa como la cantidad de enzima que convierte 1  $\mu$ mol de su aldol sustrato natural en DHAP y el aldehído correspondiente (D-GA3P para RAMA y L-lactaldehído para Fuc-1PA y Rha-1PA) por minuto en estas condiciones.

### ***Síntesis de sustratos no comerciales: L-lactaldehído, Fuc-1P y Rha-1P***

Para la medida de la actividad aldolasa de Rha-1PA y Fuc-1PA es necesario utilizar sus sustratos naturales, Rha-1P y Fuc-1P respectivamente, como sustrato en la reacción retroaldólica. Estos sustratos se sintetizaron enzimáticamente a partir de DHA y L-lactaldehído. A su vez, el L-lactaldehído no es comercial y se sintetizó a partir de D-treonina según el método descrito anteriormente en la bibliografía (Zagalak *et al.*, 1966).

#### ***- Síntesis de L-lactaldehído :***

9,1 g de ninhidrina (51 mmoles) y 3 g de D-treonina (25 mmoles) se hirvieron,



con agitación fuerte y a reflujo, en 600 ml de tampón citrato sódico 50 mM pH 5,4 durante 15 minutos. La suspensión se dejó enfriar, se filtró y se lavó el sólido con agua mili-Q. El filtrado (color rojo-violeta) se sometió a sucesivos pasos de intercambio iónico. Primero se trató con Dowex 1x8 en su forma activada  $\text{HCO}_3^-$  hasta subir el pH a 6,5 y se mantuvo en agitación entre 2 y 3 horas, después se filtró y el filtrado se trató con Dowex 50x4 en su forma activa  $\text{H}^+$  hasta bajar el pH a 4,0. Se filtró de nuevo y el filtrado se concentró por evaporación a vacío hasta un volumen de 100 ml. Fue necesario repetir estos pasos de intercambio iónico y concentración hasta que la disolución quedó incolora y en presencia de la resina de intercambio aniónico a pH 7,5 ésta no cambió de color llegando a un volumen final de unos 20-30 ml.

La valoración de la concentración de L-lactaldehído en la disolución final se realizó mediante un ensayo espectrofotométrico. El L-lactaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la aldehído deshidrogenasa en presencia de  $\text{NAD}^+$ . Esta reacción se puede seguir espectrofotométricamente midiendo el aumento de absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH, que es directamente proporcional a la concentración de L-lactaldehído.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 ml, conteniendo Tris-HCl (50 mM, pH 8,0),  $\text{NAD}^+$  (0,4  $\mu\text{moles}$ ) y aldehído deshidrogenasa (1,5 U).

- Síntesis enzimática de los aldoles naturales Rha-1P y Fuc-1P:

La Rha-1P y la Fuc-1P se sintetizaron utilizando el sistema multienzimático acoplado en una escala de 1 mmol (Sanchez-Moreno *et al.*, 2004).

Para ello, la reacción se llevó a cabo en 30 ml de tampón HEPES (20 mM pH 7,5) que contenían DHA (1 mmol), L-lactaldehído (1,5 mmoles), acetil-P (2 mmoles), ATP (68  $\mu\text{moles}$ ),  $\text{MgSO}_4$  (250  $\mu\text{moles}$ ),  $\text{ZnCl}_2$  (0,3  $\mu\text{mol}$ ), DHAK (15 U), AK (30 U) y aldolasa purificada (Rha-1PA o Fuc-1PA). La actividad aldolasa añadida a la reacción se valoró *a posteriori*, comprobándose que se correspondía con 10 U.

Tanto la Rha-1P como la Fuc-1P fueron purificadas por precipitación con  $\text{BaCl}_2$  y posterior cromatografía de intercambio aniónico (Sims y Reed 2005).

## Determinación de los parámetros cinéticos y de inhibición

### Ensayos cinéticos de la DHAK de *C. freundii*.

Los ensayos cinéticos de la actividad quinasa fueron medidos a 25 °C en placas de 96-pocillos, en un volumen total de 0,3 ml. El ensayo de actividad quinasa utilizado en todos los casos fue el basado en la mezcla enzimática  $\alpha$ -GDH/TIM, en las condiciones previamente especificadas y escalando las concentraciones indicadas al volumen final del ensayo (0,3 ml).

La medida de los parámetros cinéticos con respecto al sustrato DHA se realizó con una concentración de DHAK de 0,08  $\mu\text{g/ml}$ , valorando la actividad quinasa por cuadruplicado a diez concentraciones de DHA (entre 0,00025 y 2.5 mM) y con una concentración saturante de  $[\text{MgATP}]^{2-}$  de 5,0 mM.

Los ensayos para determinar los parámetros cinéticos con respecto al sustrato  $[\text{MgATP}]^{2-}$  fueron realizados con 1,0  $\mu\text{g/ml}$  de DHAK purificada, midiendo la actividad quinasa por triplicado a dieciséis concentraciones diferentes del complejo (entre 0,1 y 7,0 mM), usando excesos constantes de  $\text{Mg}^{2+}$  de 40 mM y concentración saturante de DHA de 2,5 mM.

En cuanto a los ensayos utilizados para determinar las constantes cinéticas de la DHAK con respecto al  $[\text{MnATP}]$ , se utilizaron concentraciones finales de enzima de 0,9  $\mu\text{g/ml}$ . La actividad quinasa se valoró por triplicado a veinte concentraciones diferentes de complejo, en el rango de 0,1 a 9,0 mM, y con una concentración saturante de DHA de 2,5 mM. Con el fin de evitar la inhibición por exceso de  $\text{Mn}^{2+}$ , la máxima concentración de  $\text{MnCl}_2$  utilizada fue de 1,3 mM, (7,5 veces menor que la concentración de ATP en cada punto del análisis cinético).

Los ensayos para determinar los parámetros cinéticos con respecto los sustratos D-GA y D,L-GA fueron realizados con 7,2  $\mu\text{g/ml}$  de DHAK purificada, midiendo la actividad quinasa por triplicado a doce concentraciones diferentes de sustrato (entre 0,05 y 5,0 mM), usando concentraciones saturantes de

[MgATP]<sup>2-</sup> de 5,0 mM.

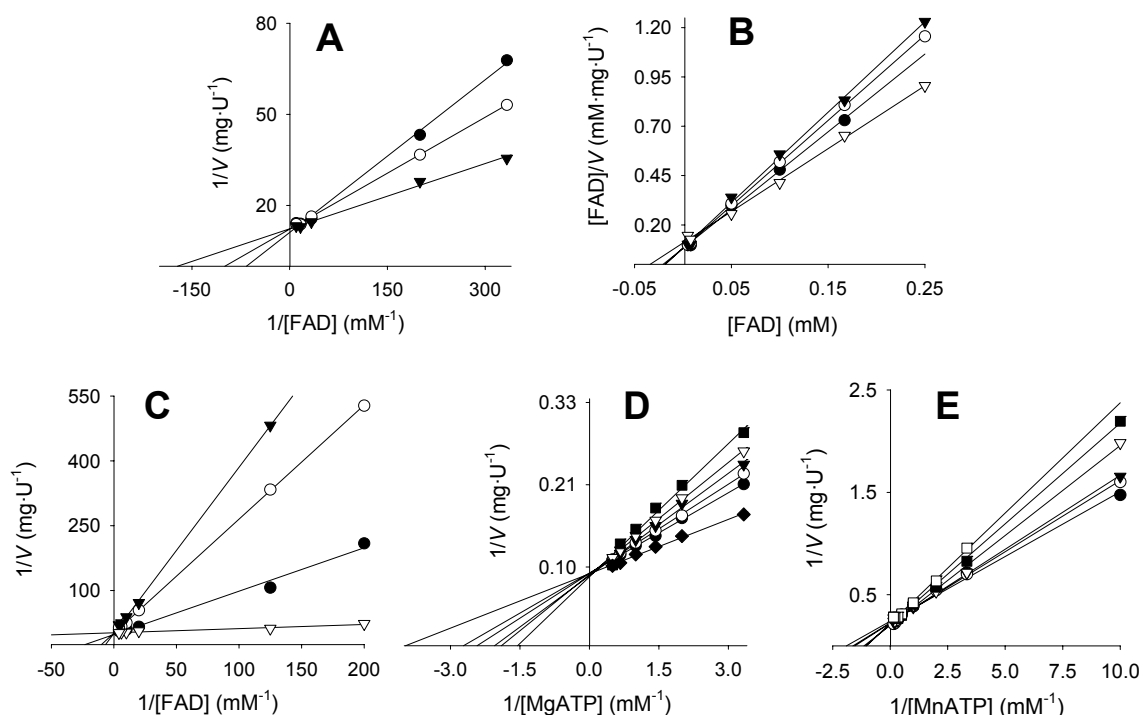
La actividad FMN-ciclasa fue valorada por duplicado a siete concentraciones diferentes del sustrato FAD (entre 0,005 y 0,25 mM), en presencia de MnCl<sub>2</sub> (12 mM) para el cálculo de los parámetros cinéticos de la DHAK con respecto a esta actividad. La concentración de DHAK utilizada fue 4,1 µg/ml en los ensayos cinéticos realizados a 25 °C, y 1,7 µg/ml en los ensayos a 37 °C.

### Ensayos de inhibición de la DHAK de *C. freundii*.

Los estudios de inhibición de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 fueron realizados mediante diferentes ensayos cinéticos con respecto a los sustratos FAD, [MgATP]<sup>2-</sup> y [MnATP], en presencia de concentraciones crecientes del inhibidor considerado (Figura 13M).

La inhibición de la actividad ciclasa por ATP (Figura 13M-A), DHA (Figura 13M-B) y AMP (Figura 13M-C) fue analizada mediante ensayos cinéticos con respecto al FAD en presencia de concentraciones crecientes de cada inhibidor. El patrón de inhibición de la actividad quinasa por AMP se analizó usando [MgATP]<sup>2-</sup> (Figura 13M-D) y [MnATP] (Figura 13M-E) como sustratos donadores de fosfato.

La inhibición de la actividad quinasa por FAD fue analizada en cinéticas con [MnATP] utilizando concentraciones crecientes del inhibidor, mediante regresión lineal de Hanes-Woolf. Las representaciones secundarias [FAD] frente a  $V_{\max}/K_M$  y [FAD] frente a  $1/V_{\max}$  fueron utilizadas para determinar los valores de  $k_{iu}$  y  $k_{ic}$  respectivamente. En este experimento no fue posible utilizar concentraciones de FAD por encima de 0,7 mM debido a que la alta absorbancia del compuesto a 340 nm, interfiere con los ensayos enzimáticos de valoración de la actividad quinasa, enmascarando la cuantificación espectrofotométrica de la desaparición de NADH.



**Figura 13M.** Cinéticas de inhibición para la DHAK de *C. freundii* CECT 4626. **A:** representación de Lineweaver-Burk de la actividad ciclasa a diferentes concentraciones de FAD, en presencia de concentraciones crecientes de ATP; 30 nM (▼), 100 nM (○) y 150 nM (●). **B:** representación de Hanes-Woolf de la actividad ciclasa a diferentes concentraciones de FAD, en presencia de concentraciones crecientes de DHA; 0 mM (▽), 50 mM (●), 100 mM (○) y 200 mM (▼). **C:** representación de Lineweaver-Burk de la actividad ciclasa a diferentes concentraciones de FAD, en presencia de concentraciones crecientes de AMP; 0 mM (▽), 0.5 mM (●), 2.5 mM (○) and 5.0 mM (▼). **D:** representación de Lineweaver-Burk de la actividad quinasa a diferentes concentraciones de MgATP y exceso constante de DHA, en presencia de concentraciones crecientes de AMP; 0 mM (◆), 3 mM (●), 6 mM (○), 9 mM (▼), 12 mM (▽) y 15 mM (■). **E:** representación de Lineweaver-Burk de la actividad quinasa a diferentes concentraciones de MnATP y exceso constante de DHA, en presencia de concentraciones crecientes de AMP; 5 mM (●), 10 mM (○), 15 mM (▼), 20 mM (▽), 25 mM (■) and 30 mM (□).

### Análisis de los datos cinéticos.

Las constantes cinéticas fueron calculadas utilizando tanto representaciones secundarias lineales como regresiones no lineales de los datos cinéticos directos obtenidos. Para ello se utilizó el programa informático *SigmaPlot 8.0* y su módulo para el tratamiento de cinéticas *Enzyme Kinetics Module 1.1*, así como el paquete estadístico SIMFIT (Holzhütter y Colosito, 1989; <http://www.simfit.man.ac.uk>).

Para la determinación de las constantes cinéticas aparentes, con la variación de un único sustrato y manteniendo el otro constante y saturante, se utilizó la ecuación de Michaelis-Mentel (Ecuación 1) y sus derivaciones para la representación lineal de los datos de velocidad.

$$V_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{K_{M,S}^{app} + [S]} \quad (1)$$

Con el fin de explicar la inhibición observada cuando la concentración del sustrato  $[MgATP]^{2-}$  superaba 7,0 mM, en ese caso concreto se aplicó también la ecuación de Michaelis-Mentel modificada para mecanismos de inhibición por exceso de sustrato (Ecuación 2):

$$V_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{K_{M,S}^{app} + [S] + \frac{[S]^2}{K_{iS,S}^{app}}} \Rightarrow \frac{V_{\max}^{app} \cdot [MgATP]}{K_{M,MgATP}^{app} + [MgATP] + \frac{[MgATP]^2}{K_{iS,MgATP}^{app}}} \quad (2)$$

donde  $K_{iS}^{app}$  es la constante aparente de inhibición por exceso de sustrato.

En los ensayos cinéticos bi-sustrato, realizados para la determinación del mecanismo enzimático mediante variación simultánea de la concentración de DHA y MgATP, se aplicó la ecuación general de Alberty (Ecuación 3) para sistemas multisustrato:

$$V_i = \frac{V_{\max} \cdot [MgATP]^{2+} \cdot [DHA]}{(K_{M,DHA} \cdot [MgATP]) + (K_{M,MgATP} \cdot [DHA]) + ([MgATP] \cdot [DHA]) + (K_S^{MgATP} \cdot K_{M,DHA})} \quad (3)$$

donde  $K_S^{MgATP}$  es la constante de disociación para el complejo (E[MgATP]) si el mecanismo de reacción transcurre a través de un complejo ternario.  $[MgATP]^{2-}$  es variable y [DHA] es constante y cercano a saturación.

La discriminación entre mecanismos enzimáticos Ping-Pong y Secuencial se determinó mediante representaciones de Hanes-Woolf de los datos cinéticos ( $[MgATP]^{2-}/V_i$  frente a  $[MgATP]^{2-}$ , a concentraciones entre 0,1 y 7 mM) y representaciones de Lineweaver-Burk ( $1/V_i$  frente a  $1/[MgATP]^{2-}$ ), a cuatro concentraciones fijas de DHA: 7.5, 10, 15 y 20  $\mu$ M. Los datos obtenidos eran

coherentes con la ecuación de Albery describiendo un mecanismo que transcurre a través de complejo ternario (Ecuación 4) (Rudolph y Fromm, 1979).

$$V_i = \frac{V_{\max} \cdot [MgATP] \cdot [DHA]}{K_S^{MgATP} + (K_{M,DHA} \cdot [MgATP]) + (K_{M,MgATP} \cdot [DHA]) + ([MgATP] \cdot [DHA])} \quad (4)$$

Los datos de velocidad inicial obtenidos en los diferentes estudios cinéticos de inhibición, fueron tratados con las ecuaciones que describen la inhibición competitiva, acompetitiva y mixta (Ecuaciones 5, 6 y 7 respectivamente).

$$V_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{K_{M,S}^{app} \left(1 + [I]/k_{ic}^{app}\right) + [S]} \quad (5)$$

$$V_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{K_{M,S}^{app} + [S] \cdot \left(1 + [I]/k_{iu}^{app}\right)} \quad (6)$$

$$V_i = \frac{V_{\max}^{app} \cdot [S]}{K_{M,S}^{app} \left(1 + [I]/k_{ic}^{app}\right) + [S] \cdot \left(1 + [I]/k_{iu}^{app}\right)} \quad (7)$$

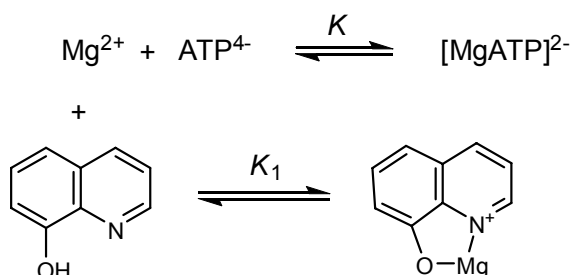
donde  $[I]$  representa la concentración de inhibidor,  $k_{ic}$  es la constante de inhibición competitiva y  $k_{iu}$  es la constante de inhibición acompetitiva.

### Cálculo de la constante de estabilidad para el complejo $[MgATP]^{2-}$ .

Para el análisis de los patrones de inhibición por exceso del sustrato  $[MgATP]^{2-}$  obtenidos con diferentes excesos de  $Mg^{2+}$ , fue necesario calcular la constante de estabilidad de este complejo, bajo las condiciones fisico-químicas presentes en los ensayos cinéticos utilizados (tampón Tris-HCl con una concentración conjunta de  $K^+$  y  $Na^+$  de 18,4 mM a 25 °C, pH 8,0, y una fuerza iónica total de 35 mM). Para el cálculo de la constante de estabilidad se utilizaron experimentos de competición con 8-hidroxiquinolina, y detección por fluorescencia (Watanabe *et al.*, 1962).

La 8-hidroxiquinolina es un biciclo aromático poco soluble en agua y que puede actuar como agente quelante de iones metálicos en disolución. De esta forma, la 8-hidroxiquinolina puede competir en disolución con el  $ATP^{4-}$  para la

formación de un complejo estable con el  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 14M).



**Figura 14M.** Equilibrios de formación de los complejos  $[\text{MgATP}]^{2-}$  y  $[\text{Mg}^{2+}\text{-8-hidroxiquinolina}]$ .  $K$  y  $K_1$  son las constantes de estabilidad para cada uno de los complejos.

El complejo  $[\text{Mg}^{2+}\text{-8-hidroxiquinolina}]$  exhibe fluorescencia a 530 nm previa excitación a 360 nm, y la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de complejo (Watanabe *et al.*, 1963). La diferencia entre la cantidad de  $\text{Mg}^{2+}$  añadida a la disolución, en presencia y ausencia de  $\text{ATP}^{4-}$ , necesaria para obtener una concentración particular de  $[\text{Mg}^{2+}\text{-8-hidroxiquinolina}]$  a partir de una concentración fija de 8-hidroxiquinolina, es equivalente a la concentración del complejo  $[\text{MgATP}]^{2-}$  formado en las condiciones de ensayo.

La medida de fluorescencia se realizó tal y como se indica en el ensayo previamente descrito para la determinación de la constante de estabilidad de complejos MgATP (Watanabe *et al.*, 1962), utilizando un espectrofluorímetro PerkinElmer LS50B. La intensidad de fluorescencia a 530 nm (apertura de rendija de 10 nm) previa activación a 360 nm (apertura de rendija de 10 nm) fue expresada en escala de porcentaje de transmisión por el fluorímetro (intensidad de fluorescencia relativa). Las mezcla de cada ensayo contenía: 8-hidroxiquinolina ( $2,0 \times 10^{-4}$  M), NaCl (9,3 mM) y KCl (9,3 mM) disueltos en 3 ml de tampón Tris-HCl 40 mM, pH 8.0, en cubetas de cuarzo con un paso de luz de 1 cm. Una disolución 4,0 M de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  fue progresivamente añadida en alícuotas de 0,5-1,0  $\mu\text{l}$ . La mezcla fue cuidadosamente mezclada y la fluorescencia medida siempre con respecto a un blanco de reacción. Tan solo dos minutos de incubación fueron necesarios para alcanzar el equilibrio en la disolución tras cada adición de  $\text{Mg}^{2+}$ . Este proceso se repitió en presencia de tres concentraciones de  $\text{ATP}^{4-}$ : 4, 8 y  $12 \times 10^{-5}$  M.

La constante de estabilidad ( $K$ ) para el complejo  $[\text{MgATP}]^{2-}$  se define según la Ecuación 8:

$$[\text{Mg}^{2+}]_0 - \frac{[\text{ATP}]_0}{2} = \frac{1 + K_1 \cdot [\text{8HQ}]_0}{K} \quad (8)$$

donde  $[\text{Mg}^{2+}]_0$  y  $[\text{8HQ}]_0$  son las concentraciones totales de  $\text{Mg}^{2+}$  y 8-hidroxiquinolina, y  $K_1$  es la constante de estabilidad del complejo  $[\text{Mg}^{2+}$ -8-hidroxiquinolina], que a pH 8,0 tiene un valor de  $500 \text{ M}^{-1}$ , según se describe en la bibliografía (Watanabe *et al.*, 1963).

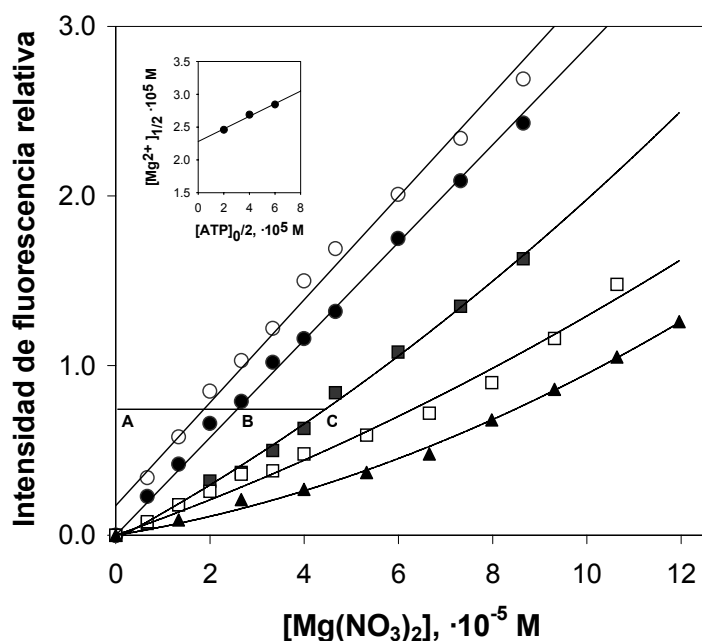
A partir de los datos de fluorescencia, la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  añadida para la cual la concentración del complejo  $[\text{MgATP}]^{2-}$  es justo la mitad que la concentración de ATP presente ( $[\text{Mg}^{2+}]_{1/2}$ ) fue calculada para cada concentración  $[\text{ATP}]_0$  (Figura 15M) y los datos obtenidos fueron representados en función de la mitad de la concentración de ATP presente ( $[\text{ATP}]_0/2$ ) (Inserto en Figura 15M). En el punto de intersección con el eje-Y se cumple que  $[\text{ATP}]_0/2$  es 0, y la Ecuación 8 puede simplificarse para dar la Ecuación 9, utilizada para determinar la constante de estabilidad  $K$ .

$$[\text{Mg}^{2+}]_{1/2} = \frac{1 + K_1 \cdot [\text{8HQ}]_0}{K} \Rightarrow K = \frac{1 + K_1 \cdot [\text{8HQ}]_0}{[\text{Mg}^{2+}]_{1/2}} \quad (9)$$

Una vez calculada la constante de estabilidad  $K$  para el complejo  $[\text{MgATP}]^{2-}$  en las condiciones del ensayo, este parámetro pudo ser utilizado para conocer las concentraciones en disolución de todas las especies implicadas en el equilibrio de formación:  $[\text{MgATP}]^{2-}$ ,  $\text{ATP}^{4-}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , mediante la Ecuación 10.

$$K = \frac{[\text{MgATP}]^{2-}}{[\text{Mg}^{2+}] \cdot [\text{ATP}^{4-}]} = \frac{[\text{MgATP}]^{2-}}{([\text{Mg}^{2+}]_0 - [\text{MgATP}]^{2-})([\text{ATP}]_0 - [\text{MgATP}]^{2-})} \quad (10)$$





**Figura 15M.** Efecto del ATP en la formación del complejo  $[\text{Mg}^{2+}\text{-8-hidroxiquinolina}]$ . La disolución de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  fue añadida en ausencia de ATP ( $\circ, \bullet$ ), y en presencia de  $4 \times 10^{-5}$  ( $\blacksquare$ ),  $8 \times 10^{-5}$  ( $\square$ ) y  $12 \times 10^{-5}$  ( $\blacktriangle$ ) M de ATP. **BC** indica la concentración de  $\text{MgATP}$  ( $2 \times 10^{-5}$  M) que es la mitad del ATP total presente en el ensayo ( $4 \times 10^{-5}$  M). **AB** indica la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre. El inserto muestra la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  añadido donde la concentración del complejo  $\text{MgATP}$  es justo la mitad del ATP presente en cada ensayo ( $[\text{Mg}^{2+}]_{1/2}$ ), representado en función de la mitad de la concentración del ATP total ( $[\text{ATP}]_0/2$ ).

## Estudios de *docking* molecular

Las simulaciones de *docking* molecular fueron realizadas con *AutoDock 3.0.4* (Morris *et al.*, 1998), que es un conjunto de programas informáticos para la automatización del proceso que emplean un algoritmo genérico (AG) como motor de búsqueda. Se utilizaron las coordenadas de la proteína DHAK de *C. freundii* DMS 30040, que fueron obtenidas a partir de la estructura depositada en el *Protein Data Bank* (1un9). Antes del *docking*, los compuestos fueron minimizados mediante mecánica molecular (PM3) utilizando campos de fuerza MM3\*. La proteína fue preparada mediante la eliminación de los heteroátomos y la adición de los átomos de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno polares y Gagsteir-Huckel fueron añadidos al compuesto mediante el uso del programa informático auxiliar *AutoDock Tools* (ADT). Las energías fueron evaluadas

desde redes potenciales recalculadas con potenciales de afinidad molecular. Los archivos con redes de afinidad fueron generados usando el programa informático auxiliar *Autogrid*. Los centros de coordinación de los ligandos analizados fueron tomados como centro de las redes de afinidad, y las dimensiones de las redes fueron 76/63/123 para el FAD, con puntos separados por 0,37 Å. Después del *docking*, las 50 soluciones fueron separadas en dos grupos con desviaciones RMS de 1 Å. Los confórmeros de FAD fueron ligados al dominio-L de unión a ATP de la DHAK. El confórmero óptimo fue el que mostró un valor mínimo de energía de *docking* de -5,38 Kcal/mol.

## Similitud de secuencias y análisis filogenético

Se realizó una búsqueda de similitud con la secuencia de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 (GeneBank Accession N° DQ473522) mediante BLASTP (Altschul *et al.*, 1997 y 2005), en la base de datos no redundante del *SwissProt* (NCBI) utilizando los parámetros establecidos por defecto. En la búsqueda fueron identificadas 30 secuencias de proteína con una similitud significativa, que fueron posteriormente analizadas mediante alineamiento con BLAST. Las 17 proteínas que mostraron diferencias máximas de secuencia por debajo de 0,75 fueron utilizadas para construir una matriz de distancia de acuerdo con el método de Kimura (Kimura, 1980). Posteriormente, el árbol filogenético *sin raíz* fue obtenido mediante el método *Fast Minimum Evolution* (Desper y Gascuel, 2002), tal como se aplica en el servidor de NCBI.

## Aplicabilidad sintética de la DHAK de *C. freundii*.

### Reacciones para la producción enzimática de DHAP y GA3P.

Las reacciones para la fosforilación de DHA o GA a escala de un mmol se realizaron en un volumen final de 20 ml conteniendo: HEPES (20 mM, pH 7,5), sustrato a fosforilar (DHA o GA, 1 mmol), MgSO<sub>4</sub> (0,25 mmoles), acetil-P (2 mmoles), ATP (35 μmoles), DHAK (60 U para la fosforilación de DHA y 250 U para la fosforilación de GA) y AK (60 U) en un volumen final de 20 ml. Las

reacciones se iniciaban con la adición del ATP. Cuando la acumulación de DHAP superaba el 95% se ajustaba el pH de la reacción a 5,0 para minimizar la degradación del producto fosforilado y posibilitar su almacenamiento y posterior utilización. Para reacciones a mayor escala de sustrato se mantuvieron las relaciones indicadas de volumen y concentración de reactivos.

### Reacciones con el sistema multienzimático para la formación estereoselectiva de enlaces C-C.

Los nombres comerciales y las estructuras de los aldehídos utilizados para las reacciones aldólicas se encuentran recogidos en la Tabla 2M.

**Tabla 2M.** Aldehídos utilizados como sustratos para las reacciones aldólicas.

R		Nombre	
<b>1</b>		L-lactaldehído	
<b>2</b>		acetaldehído	
<b>3</b>		propionaldehído	
<b>4</b>		butiraldehído	
<b>5</b>		n-valeraldehído	
<b>6</b>		isobutiraldehído	
<b>7</b>		fenilacetaldehído	
<b>8</b>		benciloxiacetaldehído	
<b>9</b>		3-(metiltio)propionaldehído	
<b>10</b>		crotonaldehído	
<b>11</b>		trans-cinamaldehído	
<b>12</b>		dimetoxiacetaldehído	
<b>13</b>		etil-3-metil-4-oxocrotonato	

### **Reacciones con la estrategia en un solo paso.**

Las reacciones en un solo paso se llevaron a cabo a temperatura ambiente, y a una escala de 0,1 mmoles, en un volumen final de 3 ml. Cada reacción contenía: HEPES (20 mM, pH 7,5), DHA (0,1 mmoles), aldehído (0,15 mmoles), acetil-P (0,2 mmoles), MgSO<sub>4</sub> (25 μmoles), ATP (3,4 μmoles), AK (6 U) y aldolasa (11,5 U de RAMA; 1 U de Fuc-1PA o 1 U de Rha-1PA). Las reacciones

con RAMA contenían 1 U de DHAK, mientras que las reacciones con Fuc-1PA y Rha-1PA contenían 1,5 y 1,7 U de DHAK respectivamente. Las reacciones con las aldolasas de clase II (Fuc-1PA y Rha-1PA) también contenían  $\text{ZnCl}_2$  (0,03  $\mu\text{moles}$ ). En tres de las reacciones se utilizó DMSO como co-disolvente para mejorar la solubilidad del aldehído: fue en las reacciones con el aldehído **7** (5,5% de DMSO), **8** (10% de DMSO) y **11** (10% de DMSO). El aldehído **7** contenía un 50% de alcohol bencílico, de forma que el contenido en alcohol de la mezcla de reacción fue de un 3,3%. Las reacciones se iniciaron con la adición de ATP (30 veces menos de ATP que de DHA).

### ***Reacciones con la estrategia en dos pasos.***

Para el primer paso (fosforilación de DHA para obtener DHAP) la mezcla de reacción a escala de 0,1 mmoles de sustrato contenía: HEPES (20mM, pH 7,5), DHA (0,1 mmoles),  $\text{MgSO}_4$  (25  $\mu\text{moles}$ ), acetil-P (0,2 mmoles), ATP (3,4  $\mu\text{moles}$ ), DHAK (6 U) y AK (6 U) en un volumen final de 2 ml. Esta primera etapa se inició con la adición de ATP (30 veces menos de ATP que de DHA).

Cuando la acumulación de DHAP fue mayor del 95% se ajustó el pH de la reacción a 6,8-6,9 (se minimiza la degradación de DHAP y es perfectamente factible la adición aldólica) y se añadieron los correspondientes aldehídos (0,15 mmoles) y RAMA (11,5 U). Debido a la baja estabilidad de la enzima RAMA en las condiciones de ensayo, fue necesario añadir 11,5 U más transcurridas 3 horas de reacción. En tres de las reacciones se utilizó DMSO como co-disolvente para mejorar la solubilidad del aldehído: fue en las reacciones con el aldehído **7** (5,5% de DMSO), **8** (10% de DMSO) y **11** (10% de DMSO). El aldehído **7** contenía un 50% de alcohol bencílico, de forma que el contenido en alcohol de la mezcla de reacción fue de un 3,3%.

Para reacciones a mayor escala de sustrato se mantuvieron las relaciones indicadas de volumen y concentración de reactivos. Cuando se partió de 0,3 mmoles del sustrato DHAP (reacciones para la purificación de aldoles) se emplearon 51,6 U de RAMA iniciales, para forzar las condiciones y obtener más aldol para su purificación. Además, se añadió más aldolasa a medida que transcurría la reacción: 12,3 U más transcurridas 1 y 3 horas desde el inicio de

la reacción. Por lo tanto, se usaron 76,2 U aldolasa totales por reacción.

- Síntesis de los aldoles **13a**, **13b** y **13c** con la estrategia en dos pasos:

La síntesis de estos compuestos se realizó siguiendo las especificaciones generales para la estrategia en dos pasos, partiendo de una cantidad inicial del sustrato DHAP de 1,2 mmoles en un volumen final de reacción de 20 ml para el primer paso y 30 ml después del segundo paso.

Para el primer paso (fosforilación de DHA para obtener DHAP) la mezcla de reacción contenía: HEPES (20mM, pH 7,5), DHA (1,2 mmoles), MgSO<sub>4</sub> (0,25 mmoles), acetil-P (2 mmoles), ATP (35  $\mu$ moles), DHAK (60 U) y AK (60 U) en un volumen final de 20 ml. Cuando la acumulación de DHAP fue mayor del 95% (llegó al 100%) se ajustó el pH de la reacción a 6,8-6,9 (se minimiza la degradación de DHAP y es perfectamente factible la adición aldólica) y se añadió el aldehído **13** (1,5 mmoles), 10 ml de agua mili-Q y la aldolasa. Antes de adicionar nueva aldolasa se retiró la proteína que se encontraba precipitada en el medio de reacción para evitar que la nueva agregarse también y prolongar así su vida útil. Las enzimas se añadieron inicialmente disueltas en agua mili-Q pH 7,5 y en las siguientes adiciones como sólido.

Para la síntesis del aldol **13a** se utilizaron 307 U iniciales de RAMA (25 mg). Además, se añadieron 120 U más de RAMA transcurridas 2,5 y 5 horas de reacción. Para la síntesis del aldol **13b** se utilizó una cantidad inicial de Rha-1PA de 42 U, añadiéndose 30 U más transcurridas 3 horas. Para la síntesis del aldol **13c** se utilizó una cantidad inicial de Fuc-1PA de 110 U, y adicionando 40 U más transcurridas 6 horas de reacción.

Métodos para el seguimiento de las reacciones enzimáticas

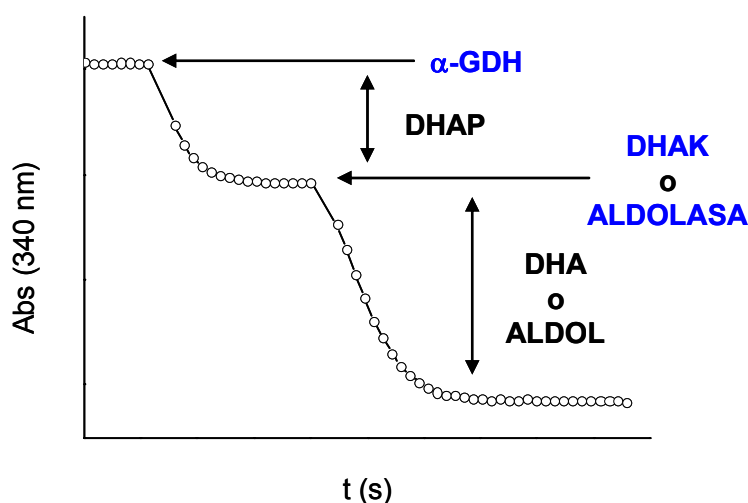
***Ensayos de valoración enzimática de sustratos y productos.***

La valoración de DHAP/aldol y DHAP/DHA en el medio de reacción nos permitió seguir el transcurso de la misma con el tiempo, mediante cuantificación de sustrato y producto. Para la valoración se tomaron se tomaron alícuotas de reacción de 50  $\mu$ L que fueron detenidas añadiendo 10  $\mu$ L de HClO<sub>4</sub> (al 7%),

posteriormente neutralizadas con 10  $\mu\text{l}$  de NaOH 1M.

- Valoración DHAP/aldol.

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5-15 minutos en un volumen final de 1 ml en cubeta (paso de luz 1 cm), conteniendo Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), NADH (0,2  $\mu\text{moles}$ ) y la muestra a valorar (entre 3 y 5  $\mu\text{l}$  de alícuota parada). La bajada en absorbancia al añadir 2 U/ml de  $\alpha$ -GDH/TIM es proporcional al contenido en DHAP y la disminución de absorbancia al añadir 0,5 U/ml de aldolasa es proporcional a la cantidad de aldol (Figura 16M).



**Figura 16M.** Ensayos de valoración de sustratos y productos en las alícuotas de reacción.

- Valoración DHAP/DHA (o D-GA3P/GA).

La valoración se realizó a temperatura ambiente en ensayos de 5 minutos en un volumen final de 1 ml en cubeta, conteniendo Tris-HCl (40 mM, pH 8,0), NADH (0,2  $\mu\text{moles}$ ), ATP (5 mM),  $\text{MgSO}_4$  (5 mM) y la muestra a valorar (entre 3 y 5  $\mu\text{l}$  de alícuota parada). La bajada en absorbancia al añadir 2 U/ml de  $\alpha$ -GDH/TIM es proporcional al contenido en DHAP o D-GA3P y la disminución de absorbancia al añadir 0,375 U/ml de DHAK es proporcional a la cantidad de DHA o GA (Figura 16M).

### **Ensayos de valoración por HPLC de sustratos y productos.**

Las reacciones aldólicas en las cuales se utilizaron aldehídos que poseen cromóforos pudieron ser monitorizadas mediante HPLC con detección UV-Vis. Esta técnica se utilizó en reacciones con los aldehídos **7**, **8** y **13**, pues tanto ellos como los aldoles resultantes presentan absorbancia a 250 nm.

Para el análisis por HPLC se utilizó la columna *Mediterranea sea*<sub>18</sub> (25 cm x 0,46 cm, Ø=5 µm; Tecknokroma), protegida mediante pre-columna del mismo material. Para el método de HPLC se utilizaron dos fases móviles diferentes: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1 % (Fase A) y CH<sub>3</sub>CN (Fase B), con flujo isocrático a 1 ml/min y detección a 250 nm. La distribución de porcentajes de cada fase a lo largo del ensayo se muestra en la Tabla 3M. Este método permitió identificar los aldehídos (tiempos de retención en torno a 14,2 min) y aldol (tiempos de retención aproximados de 4,5 min).

**Tabla 3M.** Distribución del flujo y proporción de fase A (H<sub>2</sub>O + TFA 0,1 %) y fase B (CH<sub>3</sub>CN) con el tiempo en el método de HPLC para el seguimiento de reacciones aldólicas.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flujo (ml/min)
0	80	20	1
8	80	20	1
10	15	85	1
15	15	85	1
17	80	20	1
24	80	20	1

### **Purificación de productos fosforilados.**

#### Cromatografía de intercambio aniónico.

La purificación de productos fosforilados mediante cromatografía de intercambio aniónico se realizó empleando la resina Dowex 1x8 siguiendo las condiciones previamente descritas por Sims y Reed (2005).

### Precipitación mediante sales de Ba<sup>2+</sup>.

Se centrifugó el crudo de reacción para eliminar la proteína precipitada y cualquier componente insoluble (9.000 rpm, 10.000 xg). El crudo de reacción centrifugado se pasó a través de carbón activo (empaquetado en una jeringuilla de 10 ml). Para la purificación de aldoles, durante todo el proceso se valoró la cantidad de aldol (antes y después de pasar por carbón activo) pues si el compuesto es suficientemente apolar puede quedarse parcialmente retenido en el carbón, sobre todo si tiene anillos aromáticos. Aquellos aldoles que resultaron parcialmente retenidos se recuperaron añadiendo agua/isopropanol al 5% (v/v).

El filtrado resultante del carbón activo se evaporó hasta la mitad de su volumen utilizando un rotavapor. Se ajustó el pH a 8,0 y se añadieron dos equivalentes de BaCl<sub>2</sub> con respecto a la cantidad total calculada de producto fosforilado en el crudo y un volumen de etanol 100% frío similar al volumen de fase acuosa que queda tras evaporar. La mezcla se dejó un mínimo de 5 horas precipitando a 4 °C.

Transcurrido ese tiempo, se obtuvo un precipitado blanco muy insoluble en agua. Se centrifugó para separarlo del sobrenadante (9.000 rpm, 10.000 xg). El precipitado se resuspendió (con mucha dificultad) en un volumen de agua similar al que tenía la fase acuosa antes de precipitarla y se añadió al resuspendido blanquecino resina Dowex 50Wx4 -50 (activada en forma Na<sup>+</sup>). La mezcla se mantuvo en agitación orbitálica hasta solubilizar el precipitado blanco. Finalmente el Dowex se eliminó mediante centrifugación y posterior filtrado en columna. El sobrenadante filtrado se liofilizó en tubos Falcon (50ml) para su posterior análisis mediante RMN.

### Purificación mediante HPLC

Para la purificación de productos fosforilados mediante HPLC se utilizó una variante del método previamente descrito para la detección de aldehídos y aldoles en reacciones aldólicas.

Para la purificación mediante HPLC se utilizó una columna semipreparativa



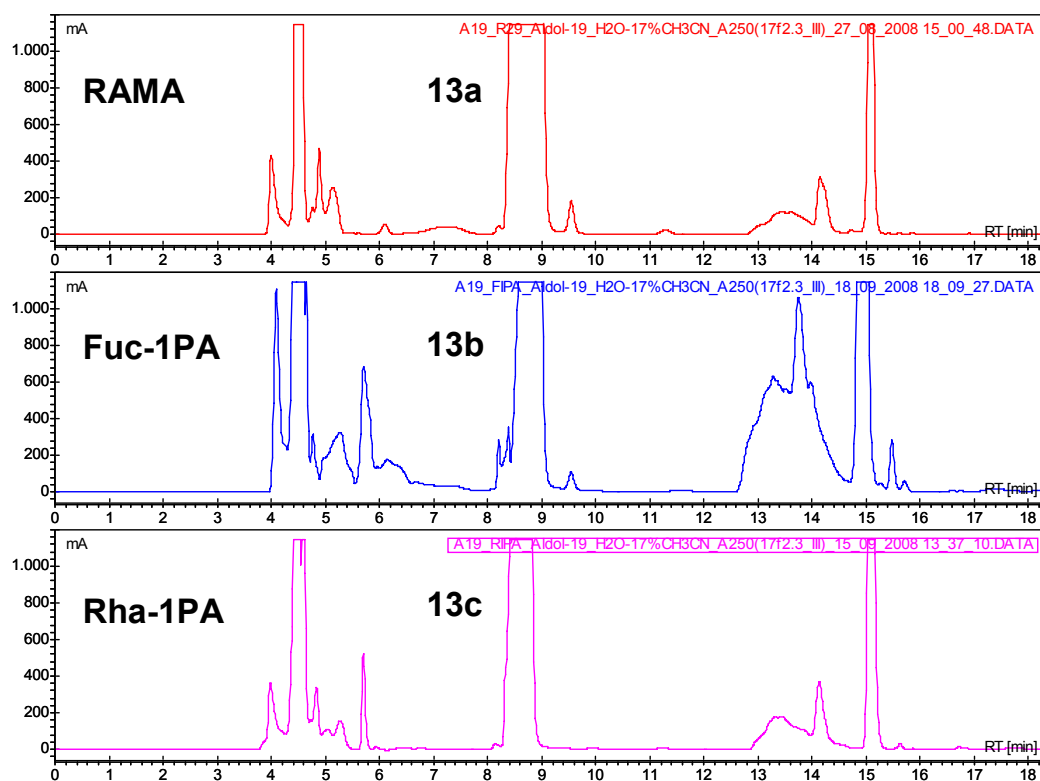
*Mediterranea sea*<sub>18</sub> (25 cm x 1,0 cm, Ø=5 µm; Tecknokroma), complementaria a la columna analítica del mismo modelo anteriormente utilizada con propósitos analíticos (25 cm x 0,46 cm, Ø=5 µm). Esta columna permitió volúmenes de inyección de crudo de reacción de 0,5 ml. Antes de la inyección, el crudo de reacción fue acidificado para la precipitación de la proteína, que se retiró mediante centrifugación (9.000 rpm, 10.000 xg). El centrifugado resultante fue filtrado con carbón activo y con filtros de 0,45 µm.

Para el método de HPLC se utilizaron dos fases móviles diferentes: H<sub>2</sub>O + TFA 0,1 % (Fase A) y CH<sub>3</sub>CN (Fase B), con detección a 250 nm. La distribución de porcentajes y flujos de cada fase a lo largo del ensayo se muestra en la Tabla 4M.

**Tabla 4M.** Distribución del flujo y proporción de fase A (H<sub>2</sub>O + TFA 0,1 %) y fase B (CH<sub>3</sub>CN) con el tiempo en el método de HPLC para la purificación de productos fosforilados.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Flujo (ml/min)
0	83	17	2,3
8	83	17	2,3
10	5	95	3,0
14	5	95	3,0
16	83	17	3,0
19	83	17	3,0
25	83	17	2,3
26	83	17	2,3

Este método permitió purificar los aldoses **13a**, **13b** y **13c**, cuyo tiempo de retención con el método es de 8,7 minutos (Figura 17M).



**Figura 17M.** Cromatogramas de HPLC obtenidos en la purificación de los aldoses **13a**, **b** y **c**.

## Modificación de la especificidad hacia el sustrato donador de fosfato mediante Evolución Dirigida.

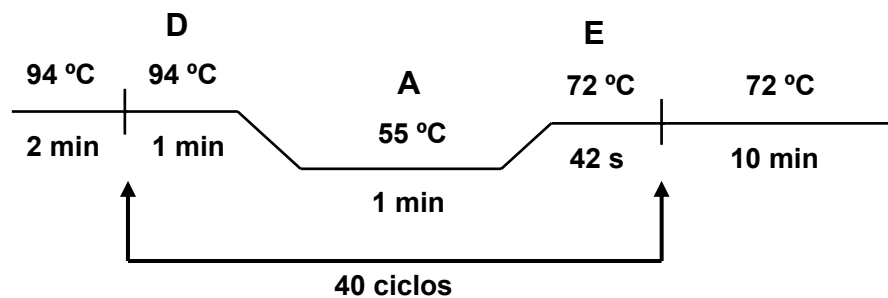
### PCR propensa a error (EP-PCR).

La amplificación por PCR se realizó empleando oligonucleótidos cebadores específicos para la amplificación del fragmento génico que codifica para el dominio-L de la DHAK, cuyo diseño se basó en el gen *dhak* de la cepa CECT 4626 de *C. freundii*. La secuencia de los oligonucleótidos específicos diseñados se muestra en la Tabla 5M.

Cada reacción de EP-PCR contenía: dNTP (0,2 mM de cada uno), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), KCl (50 mM), MnCl<sub>2</sub> (0,2 mM), 1% DMSO, oligonucleótidos cebadores (1 μM de cada uno), *Taq* polimerasa (0,5 U) y Tris-HCl (100 mM, KCl 500 mM, pH 8,3). Como ADN molde se utilizó el plásmido pRSET-*dhak*. Los ciclos de temperatura utilizados se encuentran recogidos en la Figura 18M.

**Tabla 5M.** Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento génico de *dha* que codifica para el dominio-L de la proteína.

Extremo	Diana	Oligonucleótido
N-terminal	<i>Adel</i>	5'-GCGTAGCGC <u>ACGCGT</u> -3'
C-terminal	<i>HindIII</i>	5'-TTCTAA <u>AAGCTTTT</u> AGCCCAGCTCACT-3'



**Figura 18M.** Ciclo de amplificación del gen mediante EP-PCR *dhak*. **D**: desnaturalización, **A**: anillamiento, **E**: elongación.

La heterogeneidad de la primera generación de mutantes se examinó clonando los fragmentos génicos obtenidos mediante EP-PCR en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy. La construcción resultante se transformó en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, seguido de una selección al azar de 6 colonias, de las cuales se secuenció el fragmento génico del plásmido incorporado.

### Recombinación *in vitro* mediante *DNA shuffling*.

#### ***Digestión con DNasa I.***

Se partieron de 4  $\mu$ g de ADN purificado a partir de la amplificación de EP-PCR. Los amplificados se digirieron con 0,140 U de DNasa I en tampón Tris-HCl (50 mM pH 7,4), con 1 mM MgCl<sub>2</sub> durante 5 min a temperatura ambiente. Se purificaron, mediante electroelución (Kurien y Scofield, 2002), los fragmentos génicos comprendidos entre 50-100 pb de un gel de agarosa al 2%, utilizándose un marcador de 50 pb.

### **PCR sin cebadores.**

La mezcla de reacción contenía dNTP (0,4 mM de cada uno), MgCl<sub>2</sub> (3 mM), *Taq* polimerasa (0,5 U), 20% v/v de ADN molde (fragmentos obtenidos en la digestión y electroelución) y Tris-HCl (100 mM KCl 500 mM pH 8,3) siendo necesarios 60 ciclos con la misma secuencia que para la EP-PCR (Figura 18M).

### **PCR con cebadores.**

Empleando como molde el producto de la PCR sin cebadores diluido 100 veces, y añadiendo los cebadores específicos para el fragmento génico que codifica para el dominio-L, se llevaron a cabo 40 ciclos adicionales de PCR en las condiciones ya descritas para la amplificación del gen *dhak* (Figura 1M) para obtener un único producto de PCR del tamaño correcto (620 pb).

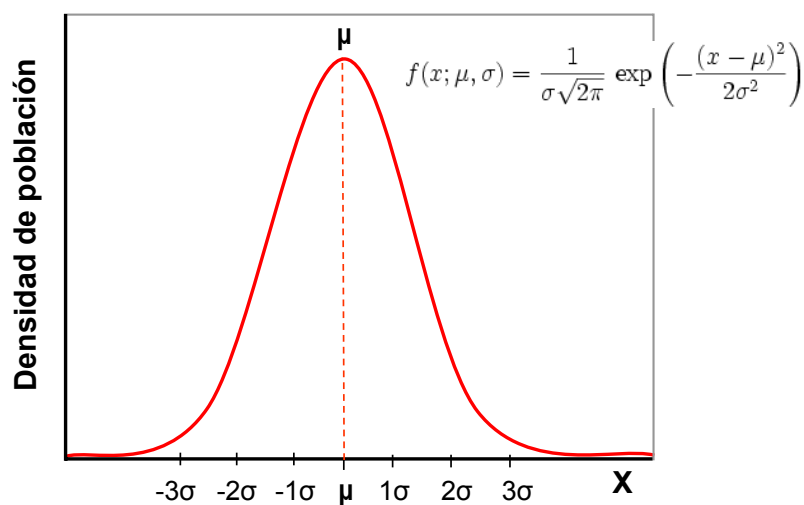
### **Screening mediante ensayo de actividad en presencia de poli-P<sub>i</sub>.**

De las colonias aisladas, 540 fueron sembradas por duplicado en placas de 96-pocillos que contenían 150 µl de LB con 2,5 µg/ml de ampicilina por pocillo. Las placas se sellaron con cinta autoadhesiva termorresistente, y se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 90 min. Transcurrido este tiempo se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubaron en esas condiciones durante 14 h. Las placas-duplicado se congelaron y almacenaron a -80 °C. Las placas inducidas se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante fue cuidadosamente decantado. El sedimento de cada pocillo fue resuspendido en 50 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se añadieron 10 µl de EDTA 50 mM, pH 8,2 y lisozima 0,35 mg/ml. Tras una hora de agitación a temperatura ambiente, se incubaron con agitación a 4 °C durante la noche. Las placas tratadas con lisozima fueron nuevamente centrifugadas (3.000 rpm, 5 min) y el sobrenadante (CFE) fue cuidadosamente recuperado para su análisis.

La actividad DHAK utilizando poli-P<sub>i</sub> se evaluó directamente en el CFE de cada uno de los mutantes, mediante el ensayo de actividad DHAK previamente descrito, y basado en el método enzimático α-GDH/TIM (Figura 9M).

### Análisis estadístico de los datos obtenidos en el *screening*.

El análisis del gran volumen de datos procedentes del *screening* mediante ensayo de actividad se realizó mediante procedimientos estadísticos generales de frecuente aplicación en poblaciones con una distribución normal en lo referente a una característica (Álvarez, 2000). La representación de esta propiedad a lo largo de una población da lugar a una distribución típica que adopta la forma denominada *campana de Gauss-Laplace* (Figura 19M).



**Figura 19M.** Distribución normal o Gaussiana de una característica  $X$  dentro de una población. La función  $f(x, \mu, \sigma)$  es la función de densidad que define la distribución.

En primer lugar se determinó que la distribución de la actividad DHAK utilizando poli- $P_i$  seguía una distribución normal a lo largo de la población. Era importante que la distribución de la actividad fuera normal tanto en la población mutante ( $X$ ) como en la población control con la DHAK sin mutar ( $C$ ), para poder establecer comparaciones estadísticas entre ambas. Para ello se aplicó sobre las series de datos obtenidas el test de Kolmogorov-Smirnov (prueba K-S), mediante análisis con el programa informático de tratamiento estadístico SIMFIT (Holzhütter y Colosito, 1989).

La prueba K-S es lo que se denomina una dódima de bondad de ajuste. Esto es, se interesa en el grado de acuerdo entre la distribución de un conjunto de valores de la muestra y alguna distribución teórica específica. La prueba determina si razonablemente puede pensarse que las mediciones muestrales

proviengan de una población que tenga esa distribución teórica. Introduciendo los valores de actividad de cada población en función del número de veces que se repite cada una de las actividades el programa permite evaluar la bondad del ajuste a la distribución teórica, que en nuestro caso es la distribución normal. En el caso de nuestros valores de actividad usando poli-P<sub>i</sub>, la prueba determinó un grado de ajuste significativo con respecto a una distribución normal, por lo que fue posible emplear métodos estadísticos basados en este tipo de distribución.

Por lo tanto, tenemos el parámetro “actividad con poli-P<sub>i</sub>” ( $x$ ), que se distribuye de forma normal en dos poblaciones: la mutante (**X**) y la control (**C**).

Para la población mutante **X** se puede definir la siguiente función de densidad que corresponde a una distribución normal de la propiedad  $x$ :

$$f(x_M, \mu_M, \sigma_M) = \frac{1}{\sigma_M \sqrt{2\pi}} = \exp\left(-\frac{(x_M - \mu_M)^2}{2\sigma_M^2}\right)$$

donde  $x_M$  es la actividad con poli-P<sub>i</sub> de la población mutante,  $\mu_M$  es la media de la actividad, y  $\sigma_M$  la desviación estándar de esta propiedad a lo largo de la población.

De igual forma, para la población control **C** se puede definir una función de densidad que corresponde a una distribución normal de la propiedad  $x$ :

$$g(x_C, \mu_C, \sigma_C) = \frac{1}{\sigma_C \sqrt{2\pi}} = \exp\left(-\frac{(x_C - \mu_C)^2}{2\sigma_C^2}\right)$$

donde  $x_C$  es la actividad con poli-P<sub>i</sub> de la población control,  $\mu_C$  es la media de la actividad, y  $\sigma_C$  la desviación estándar de esta propiedad a lo largo de la población.

Para poder comparar estas dos poblaciones de actividad se realizó un proceso de tipificación o estandarización de la población mutante **X** con respecto a la población control **C**. Y para eso se calculó el parámetro estadístico **Z** o actividad tipificada, que nos permitió evaluar para cada uno de los individuos

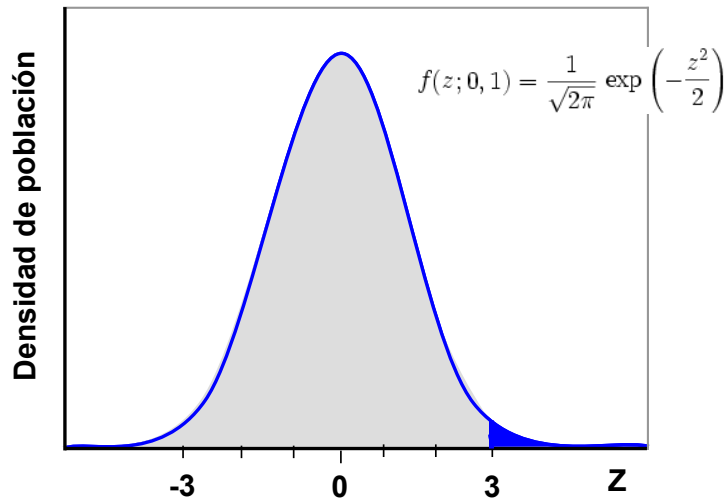
de **X**, cómo se alejan sus valores de actividad ( $x_M$ ) con respecto a su media ( $\mu_M$ ) y compararlos con la desviación estándar de las actividades  $x_C$  dentro de la población control ( $\sigma_C$ ):

$$Z = \frac{(x_M - \mu_M)}{\sigma_c}$$

De esta forma, obtuvimos una nueva función de densidad tipificada que relaciona ambas poblaciones a través del parámetro **Z**:

$$\varphi(Z,0,1) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{Z^2}{2}\right)$$

Las funciones de densidad tipificadas tienen la característica de representan una distribución gaussiana en la cual la media tiene un valor de 0, su desviación estándar es 1, y es simétrica puesto que está estandarizada con respecto a la población de referencia, en este caso **C** (Figura 20M).



**Figura 20M.** Distribución normal estándar de una población tipificada mediante el cálculo del parámetro **Z**. La función  $f(z,0,1)$  es la función de densidad tipificada que define la distribución.

Integrando el área de la gráfica descrita por la función de densidad tipificada entre dos valores de **Z** es posible calcular la probabilidad de que un individuo de la población tipificada pertenezca a la población de referencia. Esto es lo que se

llama la función de distribución:

$$P(Z \geq z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^z \exp\left(-\frac{Z^2}{2}\right) dt$$

A partir de la función de distribución se conoce que aquellos valores de una población tipificada que poseen valores de  $Z \geq 3$  tienen una probabilidad de pertenecer a la población control menor del 2 %.

$$P(Z \geq z) = \int_{-\infty}^3 (Z, 0, 1) dt \leq 2\%$$

Esto quiere decir que aquellos individuos de la población **X** que presentan un valor de  $Z \geq 3$  tienen un 98% de probabilidad de ser diferentes a la población **C**; es decir: hay un 98% de probabilidad de que ese mutante tenga una actividad utilizando poli-P<sub>i</sub> por encima de lo que sería estadísticamente representativo de una población control no mutada.

## Caracterización de los productos purificados

### Técnicas empleadas en la caracterización.

#### *Poderes rotatorios ópticos.*

El poder rotatorio del aldol **13a** se ha determinado en un polarímetro Perkin-Elmer 241 MC, en células de cuarzo de 1 dm, utilizando luz amarilla de sodio, a la temperatura de 25 °C y en los disolventes y concentraciones (g/ 100 ml) indicados.

#### *Espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN.*

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-RMN) se realizaron en espectrómetros de los modelos Varian-500 (500 MHz) y Mercury-400 (400 MHz). En cada caso, junto al disolvente deuterado y la temperatura a la que se realizó el espectro, está indicada la frecuencia en la que está registrado el mismo. También se indican los desplazamientos químicos en la



escala  $\delta$  (p.p.m.), la multiplicidad de las señales (s, singlete; d, doblete; t, triplete; c, cuartete; q, quintuplete; m, multiplete), el número de protones (deducidos por integración), el valor de las constantes de acoplamiento  $J$  (Hz) y la asignación estructural.

#### *Espectroscopia de $^{13}\text{C}$ -RMN.*

Todos los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian del modelo SYSTEM-500 (125 MHz). En cada caso se indican los desplazamientos químicos en la escala  $\delta$  (p.p.m.) y la asignación estructural.

#### *Espectroscopia de $^{31}\text{P}$ -RMN.*

El espectro de resonancia magnética nuclear de fósforo 31 ( $^{31}\text{P}$ -RMN) se realizaron en un espectrómetro Varian del modelo Mercury-400 (162 MHz).

#### *Espectroscopia de RMN bidimensional.*

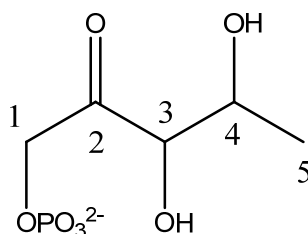
Los experimentos COSY, HSQC, HMQC, HMBC y NOESY se realizaron en un espectrómetro Varian del modelo SYSTEM-500, utilizando la frecuencia de pulsos estándar.

#### *Espectrometría de masas (EM).*

El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas de baja resolución VG 12-1250 mediante inyección directa de la muestra, usando la técnica de impacto electrónico (IE) con una energía de 70 eV y mediante ionización por Electrospray (IES-EM) en un equipo Hewlett Packard – 110 MSD). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa/carga ( $m/z$ ).

#### *Análisis elementales.*

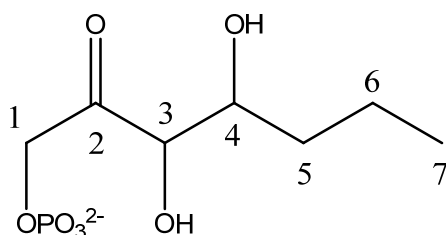
Han sido realizados con un analizador Heraeus CHN-O Rapid, y se expresan en tanto por ciento.

Lista de productos caracterizados.Aldol 2a.

2 isómeros (relación mayoritario:minoritario 3:1)

Isómero mayoritario:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  4.54 (d, 1H,  $J = 5.9$  Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.46 (d, 1H,  $J = 6.2$  Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.18 (d, 1H,  $J = 2.3$  Hz, H-3); 4.10 (dq, 1H,  $J = 6.6, 2.3$  Hz, H-4), 1.07 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>-5);  $^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  211.6 (C-2), 78.5 (C-3), 67.9 (C-4), 67.7 (C-1), 18.4 (C-5).

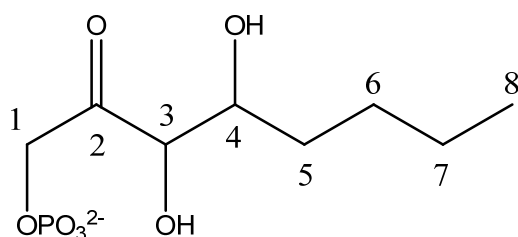
Isómero minoritario:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  4.50 (d, 1H,  $J = 6.2$  Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.42 (d, 1H,  $J = 6.2$  Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.24 (d, 1H,  $J = 4.3$  Hz, H-3); 4.0-3.9 (m, 1H, 2.3 Hz, H-4), 0.96 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz, CH<sub>3</sub>-5).

Aldol 4a.

2 isómeros (relación mayoritario:minoritario 10:1)

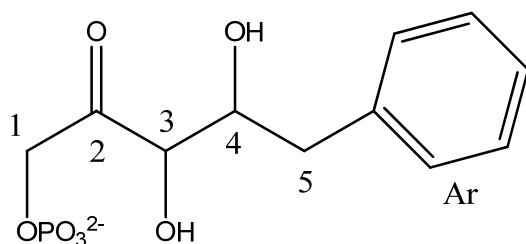
Isómero mayoritario:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  4.55 (dd, 1H,  $J = 18.7, 6.1$  Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.44 (dd, 1H,  $J = 18.7, 6.1$  Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.22 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz, H-3); 3.87 (dt, 1H,  $J = 7.0, 2.1$  Hz, H-4), 1.4-1.3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 1.3-1.1 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-6), 0.71 (t, 3H,  $J = 7.4$  Hz, CH<sub>3</sub>-7).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  212.2 (C-2), 77.6 (C-3), 71.5 (C-4), 68.1 (C-1), 34.5 (C-5), 18.5 (C-6), 13.4 (C-7).

**Aldol 5a.**

$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  4.60 (dd, 1H,  $J = 18.8, 5.9$  Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.50 (dd, 1H,  $J = 18.8, 5.9$  Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.27 (s, 1H, H-3); 3.90 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz, H-4), 1.5-1.4 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-5), 1.3-1.1 (m, 4H, CH<sub>2</sub>-6, CH<sub>2</sub>-7), 0.72 (t, 3H,  $J = 6.9$  Hz, CH<sub>3</sub>-8).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  212.1 (C-2), 77.6 (C-3), 71.9 (C-4), 68.1 (C-1), 32.1 (C-5), 27.4 (C-6), 22.1 (C-7), 13.6 (C-8).

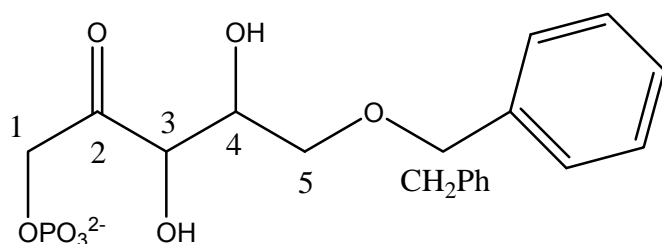
**Aldol 7a.**

2 isómeros (relación mayoritario:minoritario 8:1)

Isómero mayoritario:  $^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  7.2-7.1 (m, 5H, Ar), 4.53 (d, 1H,  $J = 6.3$  Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.49 (d, 1H,  $J = 6.3$  Hz, H-1<sub>B</sub>), 4.2-4.1 (m, 2H, H-3, H-4), 2.9-2.7 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-5).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  211.9 (C-2), 138.2 (Cq-Ar), 129.3-128.4 (C-Ar), 77.1 (C-3), 73.1 (C-4), 70.8 (C-1), 39.8-38.2 (C-5).

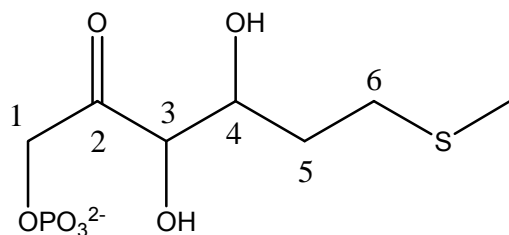
### Aldol 8a.



$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, DO, 298 K):  $\delta$  7.2-7.1 (m, 5H, Ar), 4.52 (dd, 1H,  $J$ = 18.5, 5.8 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.40 (dd, 1H,  $J$ = 18.5, 5.8 Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.4-4.3 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.1-4.0 (m, 1H, H-3), 3.5-3.4 (m, 1H, H-4), 3.5-3.4 (m, 1H, H-4), 3.27 (d, 2H,  $J$ = 4.9 Hz).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K):  $\delta$  212.3 (C-2), 129.5 (Ar), 129.3 (Ar), 128.9 (Ar), 128.6 (Ar), 75.5 (C-1); 73.1 (C-5); 72.4 (CH<sub>2</sub>Ph); 70.5 (C-4); 70.2 (C-3).

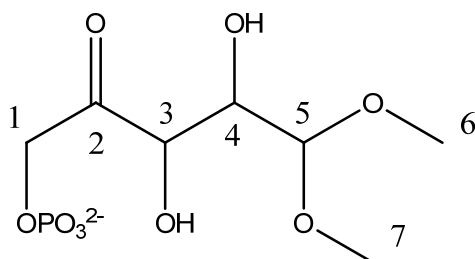
### Aldol 9a.



$^1\text{H}$  RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K):  $\delta$  4.55 (dd, 1H,  $J$ = 18.8, 6.6 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.45 (dd, 1H,  $J$ = 18.8, 6.6 Hz, H-1<sub>B</sub>); 4.28 (d, 1H,  $J$ = 2.2 Hz, H-3); 4.05 (ddd, 1H,  $J$ = 14.4, 11.5, 9.2 Hz, H-4), 2.5-2.4 (m, 2H, H-6), 1.95 (s, 3H, Me), 1.8-1.7 (m, 2H, H-5).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K):  $\delta$  211.5 (C-2), 77.7 (C-3), 70.4 (C-4), 68.1 (C-1), 29.6 (C-6), 23.5 (C-5); 14.3 (Me).

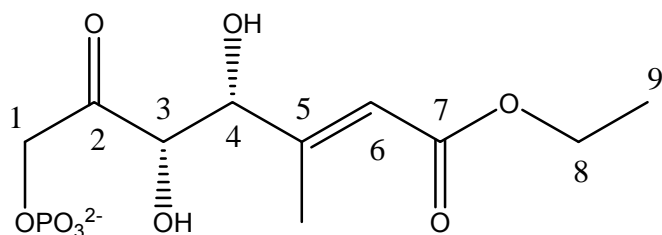
### Aldol 12a.



$^1\text{H}$  RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  4.54 (dd, 1H,  $J$  = 18.8, 6.1 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.48 (dd, 1H,  $J$  = 18.8, 6.1, H-1<sub>B</sub>), 4.42 (m, 1H, H-3), 4.34 (d, 1H,  $J$  = 7.5 Hz, H-5), 3.9-3.8 (m, 1H, H-4), 3.30 (s, 3H, OMe), 3.28 (s, 3H, OMe).

$^{13}\text{C}$  RMN (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  211.3 (C-2), 105.1 (C-5), 75.1 (C-3), 70.9 (C-4), 68.2 (C-1), 56.1(OMe), 54.8 (OMe).

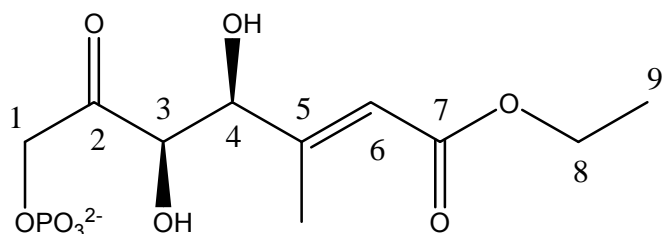
### Aldol 13a.



$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  - 1.67 (C 0.9,  $\text{D}_2\text{O}$ );  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  5.85 (s, 1H, H-7), 4.72 (dd, 1H,  $J$  = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.63 (dd, 1H,  $J$  = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>B</sub>), 4.52 (d, 1H,  $J$  = 2.2 Hz, H-3), 4.48 (s, 1H, H-4), 4.00 (c, 2H,  $J$  = 7.1 Hz, H-9), 1.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -6), 1.08 (t, 3H,  $J$  = 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ -10);  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  208.7 (C-2), 168.9 (C-8), 157.3 (C-5), 116.0 (C-7), 75.5 (C-3), 75.1 (C-4), 69.1 (C-1), 61.3 (C-9), 15.5 (C-6), 13.5 (C-10). EM (IES-EM):  $m/z$  311.0 (M+1), 623.2 (2xM+1); Anal. Calcd para  $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_9\text{P}^{2-}$ : C, 38.47; H, 5.49. Encontrado: C 38.61; H 5.75.

Masas exactas (IES-MFE):  $m/z$  311,0536 (M+1); calculada:  $m/z$  310,0465.

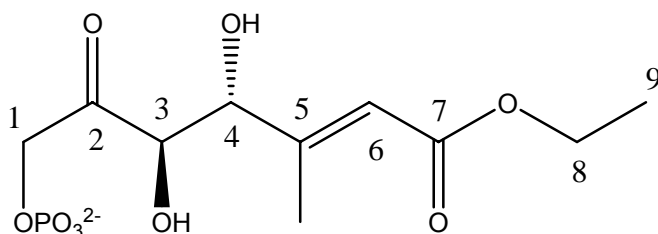
### Aldol 13b.



$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  5.73 (s, 1H, H-7), 4.71 (dd, 1H,  $J$  = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.62 (dd, 1H,  $J$  = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>B</sub>), 4.31 (d, 1H,  $J$  = 5.9 Hz, H-3), 4.18 (d, 1H,  $J$  = 6.1 Hz, H-4), 3.90 (c, 2H,  $J$  = 7.1 Hz, H-9), 1.99 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ -6), 1.08 (t, 3H,  $J$  = 7.1 Hz,  $\text{CH}_3$ -10);  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  208.7 (C-2), 168.6 (C-8), 156.2 (C-5),

117.7 (C-7), 76.9 (C-4), 75.2 (C-3), 69.4 (C-1), 61.3 (C-9), 15.7 (C-6), 14.5 (C-10). EM (IES-EM):  $m/z$  311.0 (M+1), 623.2 (2xM+1).

### Aldol 13c.

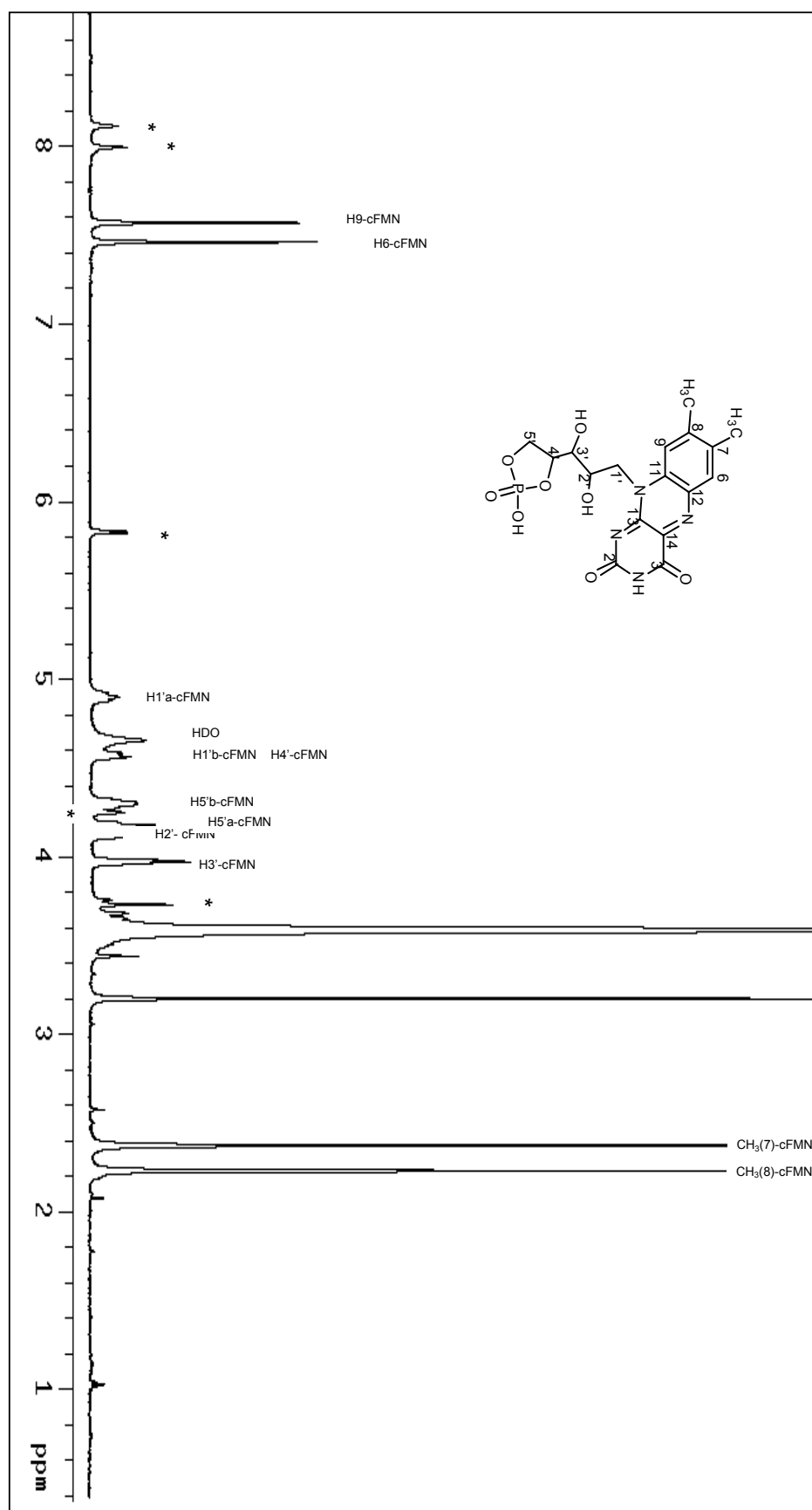


$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  5.84 (s, 1H, H-7), 4.72 (dd, 1H,  $J$ = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>A</sub>), 4.63 (dd, 1H,  $J$ = 18.3, 7.5 Hz, H-1<sub>B</sub>), 4.51 (d, 1H,  $J$ = 2.2 Hz, H-3), 4.48 (s, 1H, H-4), 4.00 (c, 2H,  $J$ = 7.1 Hz, H-9), 1.91 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-6), 1.08 (t, 3H,  $J$ = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>-10);  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 298 K):  $\delta$  208.7 (C-2), 168.9 (C-8), 157.3 (C-5), 116.0 (C-7), 75.5 (C-3), 75.1 (C-4), 69.1 (C-1), 61.3 (C-9), 15.5 (C-6), 13.5 (C-10). EM (IES-EM):  $m/z$  311.0 (M+1), 623.2 (2xM+1).

### Riboflavina-4'-5'-fosfato cíclica (cFMN).

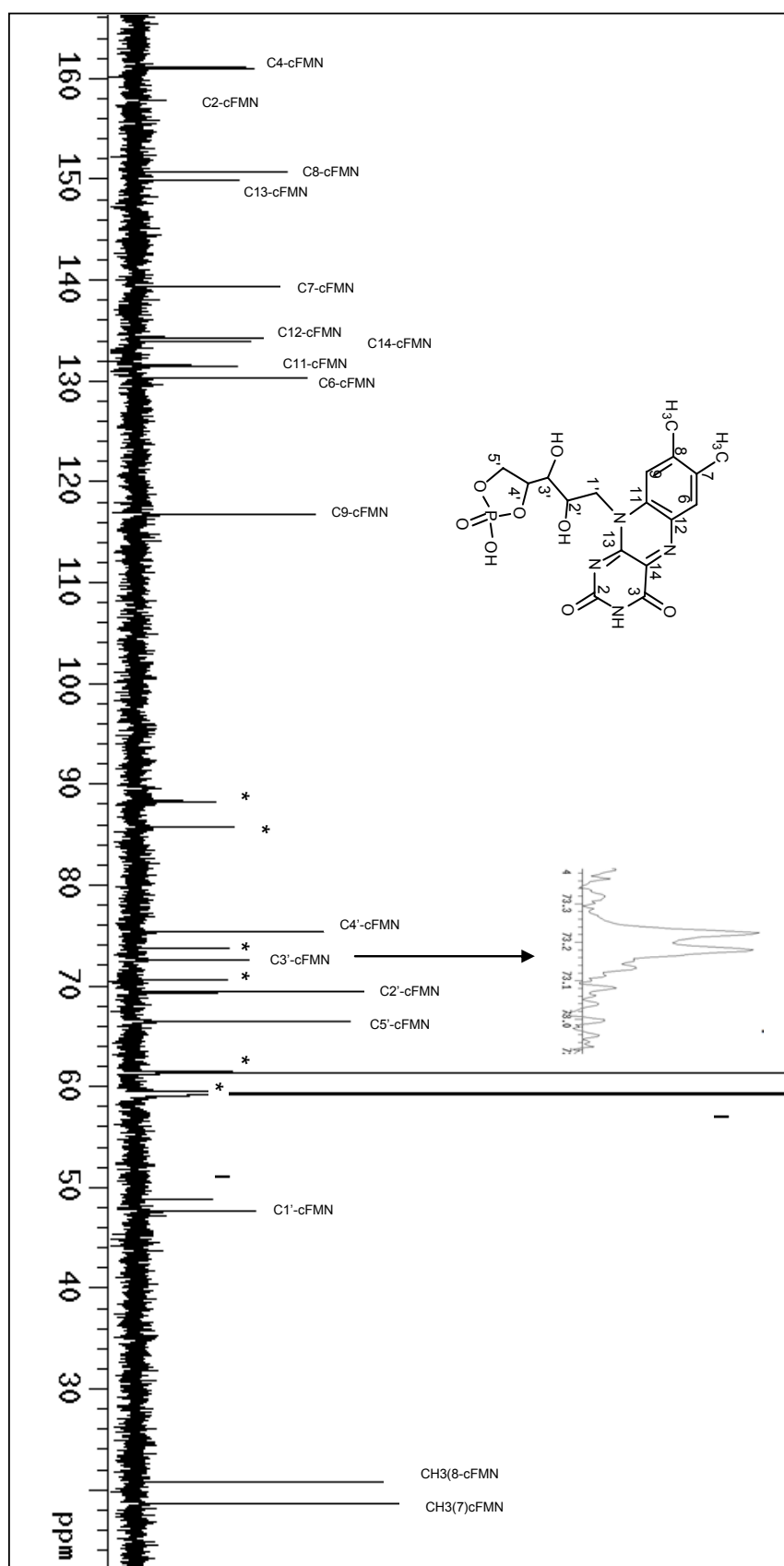
La asignación de las señales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN para este compuesto se muestra en el apartado de Resultados de esta memoria (Tabla 4R). A continuación se adjuntan los espectros 1D de  $^{31}\text{P}$  (Figura 21M),  $^1\text{H}$  (Figura 22M) y  $^{13}\text{C}$  (Figura 23M) realizados para el purificado del compuesto en los cuales se aprecia el producto mayoritario (cFMN) y el minoritario (AMP) producidos por la actividad FMN-ciclasa de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626.





**Figura 22M.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN (500MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del cFMN y del compuesto minoritario AMP (\*).





**Figura 23M.** Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN (125MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) del cFMN. \* AMP; <sup>1</sup> Impurezas.



## CONCLUSIONES.

Las conclusiones obtenidas en la presente Tesis se pueden agrupar entorno a los tres grandes aspectos tratados: caracterización bioquímica; aplicación sintética y evolución dirigida.

La completa caracterización bioquímica a la que hemos sometido a esta enzima nos ha permitido concluir:

- La DHAK presente en la cepa CECT 4626 de *C. freundii* es una nueva variante, con un 96% de homología en secuencia aminoacídica con respecto al enzima hasta ahora descrita de la cepa DMS 30040 del mismo microorganismo. Su eficiencia catalítica  $k_{cat}/K_M$  calculada con respecto a la DHA ( $3,2 \times 10^6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) es la más alta descrita para una DHAK.
- La DHAK de *C. freundii* CECT 4626 presenta inhibición por exceso de  $[\text{MgATP}]^{2-}$ , aunque el patrón cinético de inhibición no se ajusta al modelo matemático existente para tal supuesto. Los resultados obtenidos hasta ahora apuntan a la posibilidad de una inhibición alostérica por exceso del sustrato  $[\text{MgATP}]^{2-}$ .
- Hemos descrito la existencia de una actividad ciclasa promiscua. Hemos podido demostrar que las dos actividades son catalizadas por el mismo centro activo y que esta promiscuidad catalítica está modulada por el catión divalente que forma el complejo con el sustrato fosforilado. Los resultados que hemos presentado indican que una nueva función enzimática ha evolucionado a partir de una actividad promiscua preexistente sin necesidad de duplicación génica previa. En resumen, en este trabajo hemos conseguido, no sólo capturar una

instantánea del proceso evolutivo de un enzima con promiscuidad catalítica sino proponer un mecanismo que explica como se pueden mantener las dos actividades a lo largo del proceso evolutivo.

Los estudios de aplicabilidad sintética realizados sobre la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 nos han permitido concluir:

- La utilización de la DHAK de *C. freundii* CECT 4626 permite la obtención de DHAP y D-GA3P con rendimientos prácticamente cuantitativos con respecto al sustrato. Los productos así obtenidos pueden utilizarse acoplados a otras reacciones enzimáticas sin necesidad de ninguna purificación.
- Hemos desarrollado un sistema multienzimático para la formación estereoselectiva de enlaces C-C que es robusto, ya que se puede generalizar a las distintas aldolasas dependientes de DHAP con una amplia batería de aldehídos con diversidad estructural, y es flexible puesto que posibilita la aplicación de estrategias en uno o dos pasos, que le permite adaptarse a diferentes condiciones de reacción, como la presencia de co-disolventes.
- La utilización del sistema multienzimático desarrollado nos ha permitido describir por primera vez que un aldehído  $\alpha,\beta$ -insaturado como el etil-3-metil-4-oxocrotonato puede ser sustrato de RAMA. Este mismo aldehído puede ser utilizado también por las otras aldolasas dependientes de DHAP en el contexto de este sistema multienzimático, posibilitando la síntesis enantiocomplementaria de aldoles altamente funcionalizados.

Por último, del programa de Evolución Dirigida de la DHAK podemos concluir:

- La estrategia de evolución aplicada, el método de *screening* y el análisis estadístico de los resultados se han mostrado tremendamente eficaces al permitir detectar 16 mutantes positivos en un *screening* de sólo 540 colonias y de los que solamente 5 se pueden considerar falsos positivos.
- Los mutantes positivos de la primera generación se pueden clasificar en tres grupos claramente diferenciados en función de su actividad específica empleando poli-P<sub>i</sub>: i) los mutantes 1H2, 5F12 y 3E4, que muestran una

actividad entorno a la decena de mU por mg de proteína (entre 7 y 14 mU/mg); ii) los mutantes 5A2, 5B1, 2C1 y 2H3, con una actividad específica intermedia (entre 1,5 y 3,0 mU/mg) y iii) los mutantes 2D1, 3C3, 3H2, 4B3, 5C1, 6A3, 6D5, 6D6 y 6F2, cuya actividad específica es baja o muy baja (igual o inferior a 0,5 mU/mg).

- La actividad promiscua de la DHAK también se ha visto afectada por el proceso evolutivo aunque el proceso evolutivo se diseñó al margen de ella.
- En el mutante 1H2, una única mutación —Glu526Lys— es responsable de la aparición de la actividad con poli- $P_i$ . Esta mutación cambia una carga negativa del ácido glutámico por una positiva de la lisina. Dado que el poli- $P_i$  tiene cargas negativas, este cambio podría facilitar la correcta disposición del sustrato en el centro activo para que tenga lugar la transferencia del grupo fosfato a la DHA. Este hecho se ve respaldado en que la nueva carga positiva se sitúa en un lazo muy flexible que podría unir el poli- $P_i$  y orientarlo hacia el centro activo.



## BIBLIOGRAFÍA.

- Aharoni, A., Griffiths, A.D. y Tawfik, D.S. (2005a) "High-throughput screens and selections of enzyme-encoding genes." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 210-216.
- Aharoni, A., Gaidukov, L., Khersonsky, O., McQ Gould, S., Roodveldt, C. y Tawfik, D.S. (2005b) "The 'evolvability' of promiscuous protein functions." *Nat. Genet.* **37**, 73-76.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A.A. y Yu, Y.K. (2005) "Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices." *FEBS J.* **272**, 5101-5109.
- Álvarez S.J. (2000) "Estadística aplicada teoría y problemas", Ed. Clag S.A.
- Antikainen N.M. y Martin S.F. (2005) "Altering protein specificity: techniques and applications", *Bioorg. Med. Chem.*, **13**, 2701-2716.
- Armstrong, R.N. (2000) "Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily." *Biochemistry.* **39**, 13625-13632.
- Asenjo, J. y Andrews, B. (2008) "Challenges and trends in bioseparations." *J Chem. Technol. Biotechnol.* **83**, 117-120.
- Babel, W., Hofmann, K.H., (1982) "The relationship between the assimilation of methanol and glycerol in yeasts." *Arch. Microbiol.* **132**, 179-184.
- Bächler, C., Flückinger-Brühwiler, K., Schneider, P., Bähler, P. y Erni, B. (2005) "From ATP as substrate to ADP as coenzyme: functional evolution of the nucleotide binding subunit of dihydroxyacetone kinases." *J. Biol. Chem.* **280**, 18321-18325.
- Ballou, C.E. y Fischer, O.L. (1956) "The synthesis of dihydroxyacetone phosphate." *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1659-1661.
- Barbas, C.F., Heine, A., Zhong, G., Hoffmann, T., Gramatikova, S., Björnstedt, R., List, B., Anderson, J., Stura, E.A., Wilson, I.A. y Lerner, R.A. (1996) "Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope." *Science.* **278**, 2085-2092.
- Bastida, A., Fernández-Mayoralas, A., Gómez-Arrayás, R., Iradier, F., Carretero, J.C. y García-Junceda, E. (2001) "Heterologous over-expression of  $\alpha$ -1,6-Fucosyltransferase from *Rhizobium* sp.: application to the synthesis of the trisaccharide  $\beta$ -d-GlcNAc(1 $\rightarrow$ 4)-[ $\alpha$ -l-Fuc-(1 $\rightarrow$ 6)]-d-GlcNAc, study of the acceptor specificity and evaluation of polyhydroxylated indolizidines as inhibitors." *Chem. Eur. J.* **7**, 2390-2397.

- Bednarski, M.D., Waldmann, H.J. y Whitesides, G.M. (1986) "Aldolase-catalyzed synthesis of complex C-8 and C-9 monosaccharides." *Tetrahedron Lett.* **27**, 5807-5810.
- Bednarski, M.D., Simon, E.S., Bischofberger, N., Fessner, W.-D., Kim, M.J., Lees, W., Saito, T., Waldmann, H. y Whitesides, G.M. (1989) "Rabbit muscle aldolase as a catalyst in organic synthesis." *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 627-635.
- Benov, L. y Beema, A.F. (2003) "Superoxide-dependence of the short chain sugars-induced mutagenesis." *Free Radical Biol. Med.* **34**, 429-433.
- Bershtein, S. y Tawfik, D.S. (2008) "Advances in laboratory evolution of enzymes." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**, 151-158.
- Beutler, R., Kämpfer, U., Schaller, J. y Erni, B. (2001) "Heterodimeric dihydroxyacetone kinase from a *ptsI* mutant of *Escherichia coli*." *Microbiology* **147**, 249-250.
- Boehncke, W.H. y Schon, M.P. (2003) "Interfering with leukocyte rolling-a promising therapeutic approach in inflammatory skin disorders?." *Trends. Pharmacol. Sci.* **24**, 49-52.
- Bolt, A., Berry, A. y Nelson, A. (2008) "Directed evolution of aldolases for exploitation in synthetic organic chemistry." *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 318-330.
- Bornscheuer, U.T. y Kazlauskas, R.J. (2004) "Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **43**, 6032-6040.
- Bouvet, O.M., Lenormand, P., Ageron, E. y Grimont, P.A. (1995) "Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the *Enterobacteriaceae*." *Res. Microbiol.* **146**, 279-290.
- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacket, M. y Labarre, J., (1999) "The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons." *Mol. Microbiol.* **33**, 274-283.
- Bradford M.M. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- Breuer, M. y Hauer, B. (2003) "Carbon-carbon coupling in biotransformation." *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 570-576.
- Bystrykh, L.V., Koning, W. y Harder, W. (1990) "Triokinase from *Candida boidinii*." *Methods Enzymol.* **188**, 445-451.
- Cabezas, A., Pinto, R.M., Fraiz, F., Canales, J., González-Santiago, S. y Cameselle, J.C. (2001) "Purification, characterization, and substrate and inhibitor structure-activity studies of rat liver FAD-AMP lyase (cyclizing): preference for FAD and specificity for splitting ribonucleoside diphosphate-X into ribonucleotide and a five-atom cyclic



- phosphodiester of X, either a monocyclic compound or a cis-bicyclic phosphodiester-pyranose fusion." *Biochemistry*. **40**, 13710-13722.
- Cabezas, A., Costas, M.L., Pinto, R.M., Couto, A. y Cameselle, J.C. (2005) "Identification of human and rat FAD-AMP lyase (cyclic FMN forming) as ATP-dependent dihydroxyacetone kinase." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 1682-1689.
- Cabrera, R., Ambrosio, A.L., Garratt, R.C., Guixé, V. y Babel, J. (2008) "Crystallographic structure of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli* in complex with two ATP molecules. Implications for substrate inhibition." *J Mol Biol.* **383**, 588-602.
- Calderón, F., Fernández, R., Sánchez, F. y Fernández-Mayoralas, A. (2005) "Asymmetric Aldol Reaction Using Immobilized Proline on Mesoporous Support." *Adv. Synth. Catal.* **347**, 1395-1403.
- Campos, G., Guixé, V. y Babul, J. (1984) "Kinetic mechanism of phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme with a different mechanism." *J. Biol. Chem.* **259**, 6147-6152.
- Camps-Bres, F., Sánchez-Moreno, I., García-Junceda, E. y Lemaire, M. (2009) "Aldolases mediated synthesis of nitro- and aminocyclitols: towards treatment of lysosomal diseases." *Biotrans 2009* (9<sup>th</sup> International Symposium in Biocatalysis and Biotransformations).
- Canales, J., Cabezas, A., Pinto, R.M. y Cameselle, J.C. (2005) "Fluorimetric HPLC detection of endogenous riboflavin 4',5'-cyclic phosphate in rat liver at nanomolar concentrations." *Anal. Biochem.* **341**, 214-219.
- Castillo, J.A., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M.P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G.A., Joglar, J. y Clapes, P. (2006) "Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of D-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays." *Org. Lett.* **8**, 6067-6070.
- Charmantray, F., El Blidi, L., Gefflaut, T., Hecquet, L., Bolte, J. y Lemaire, M. (2004) "Improved straightforward chemical synthesis of dihydroxyacetone phosphate through enzymatic desymmetrization of 2,2-dimethoxypropane-1,3-diol." *J. Org. Chem.* **69**, 9310-9312.
- Charmantray, F., Dellis, P., Samreth, S. y Hecquet, L. (2006) "An efficient chemoenzymatic route to dihydroxy acetone phosphate from glycidol for the in situ aldolase-mediated synthesis of monosaccharides." *Tetrahedron Lett.* **47**, 3261-3263.
- Cheek, S., Ginalska, K., Zhang, H. y Grishin, N.V. (2005) "A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases." *BMC Struct. Biol.* **5**, 6.
- Chen, P.-Y., Lin, C.-C., Chang, Y.-T., Lin, S.-C. y Chan, S.I. (2002) "One O-linked sugar can affect the coil-to-beta structural transition of the prion peptide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 12633-12638.

- Chênevert, R., Lavoie, M. y Dasser, M. (1997) "Use of aldolases in the synthesis of non-carbohydrate natural products. Stereoselective synthesis of aspicilin C-3-C-9 fragment." *Can. J. Chem.* **75**, 68-73.
- Chênevert, R. y Dasser, M. (2000) "Chemoenzymatic synthesis of the microbial elicitor (-)-syringolide via a fructose 1,6-diphosphate aldolase-catalyzed condensation reaction." *J. Org. Chem.* **65**, 4529-4531.
- Chica, R.A., Doucet, N. y Pelletier, J.N. (2005) "Semi-rational approaches to engineering enzyme activity: combining the benefits of directed evolution and rational design." *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 378-384.
- Cline, J., Braman, J.C. y Hogrefe, H.H. (1996) "PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermoestable DNA polymerases." *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Cohen, N., Abramov, S., Dror, Y. y Freeman, A. (2001) "In vitro enzyme evolution: the screening challenge of isolating the one in a million." *Trends biotechnol.*, **12**, 507-510.
- Colbran, R.L., Jones, J.K.N., Matheson, N.K., Rozema, I. (1967) "A synthesis of dihydroxyacetone phosphate from dihydroxyacetone." *Carbohydr. Res.* **4**, 355-358.
- Concia, A.L., Lozano, C., Castillo, J.A., Parella, T., Juglar, J. y Clapés, P. (2009) "D-Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: cascade chemical-enzymatic preparation of sugar-related polyhydroxylated compounds." *Chem. Eur. J.* **15**, 3808-3816.
- Copley, S.D. (2003) "Enzymes with extra talents: moonlighting functions and catalytic promiscuity." *Curr. Opin. Chem.* **7**, 265-272.
- Cornish-Bowden, A., (2004) "Fundamentals of enzyme kinetics." 3<sup>a</sup> ed. *Portland Press*, London.
- Crans, D.C. y Whitesides, G.M. (1983) "A convenient synthesis of disodium acetyl phosphate for use in *in situ* ATP cofactor regeneration." *J. Org. Chem.* **48**, 3130-3132.
- Crans, D.C. y Whitesides, G.M. (1985a) "Glycerol kinase: substrate specificity." *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7008-7018.
- Crans, D.C. y Whitesides, G.M (1985b) "Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, *sn*-glycerol-3-phosphate, and chiral analogues." *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 7019-7027.
- Crans, D.C., Sudhakar, K. y Zamborelli, T.J. (1992) "Interaction of rabbit muscle aldolase at high ionic strengths with vanadate and other oxoanions." *Biochemistry.* **31**, 6812-6821.
- D'Arrigo, P., Piergianni, V., Pedrocchi-Fantoni, G. y Servi, S. (1995) "Indirect enzymatic phosphorylation: preparation of dihydroxyacetone phosphate." *Chem. Commun.* 2505-2506.

- Daniel, R. y Gottschalk, G. (1991) "Growth temperature-dependent activity of glycerol dehydratase in *Escherichia coli* expressing the *Citrobacter freundii* dha regulon." *FEMS Microbiol. Lett.* **79**, 281-285.
- Daniel, R., Stuerz, K. y Gottschalk, G. (1995) "Biochemical and molecular characterization of the oxidative branch of glycerol utilization by *Citrobacter freundii*." *J Bacteriol.* **177**, 4392-401.
- Danishefsky, S.J. y Allen, J.R. (2000) "From the laboratory to the clinic: a retrospective on fully synthetic carbohydrate-based anticancer vaccines." *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 836-863.
- Desper, R., Gascuel, O. (2002) "Fast and accurate phylogeny reconstruction algorithms based on the minimum-evolution principle." *J. Comput. Biol.* **9**, 687-705.
- Diao, F., Li, S., Tian, Y., Zhang, M., Xu, L.G., Zhang, Y., Wang, R.P., Chen, D., Zhai, Z., Zhong, B., Tien, P. y Shu, H.B. (2007) "Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 11706-11711.
- Dinkelbach, M., Hodenius, M., Steigel, A. y Kula, M.R. (2001) "Fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus carnosus*: selective enzymatic synthesis of ketose-1-phosphates and successive reactions to 1,3-dioxanes." *Biocatal. and Biotransform.* **19**, 51-68.
- Dove, A. (2001) "The bittersweet promise of glycobiology." *Nat. Biotechnol.* **19**: 913-917.
- Drueckhammer, D.G., Durrwachter, J.R., Pedersen, R.L., Crans, D.C., Daniels, L. y Wong, C.-H. (1989) "Reversible and *in situ* formation of organic arsenates and vanadates as organic phosphate mimics in enzymatic reactions: mechanistic investigation of aldol reactions and synthetic applications." *J. Org. Chem.* **54**, 70-77.
- Dube, D.H. y Bertozzi, C. R. (2005) "Glycans in cancer and inflammation [mdash] potential for therapeutics and diagnostics." *Nat. Rev. Drug. Discov.* **4**, 477-488.
- Dumaz, N. y Marais, R. (2005) "Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways." *FEBS. J.* **272**, 3491-3504.
- Dwek, R.A., Butters, T.D., Platt, F.M. y Zitzmann, N. (2002) "Targeting glycosylation as a therapeutic approach." *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 65-75.
- Effenberger, F. y Straub, A. (1987) "A novel convenient preparation of dihydroxyacetone phosphate and its use in enzymatic aldol reactions." *Tetrahedron Lett.* **28**, 1641-1644.
- El Blidi, L., Ahbala, M., Bolte, J. y Lemaire, M. (2006) "Straightforward chemo-enzymatic synthesis of new aminocyclitols, analogues of valiolamine and their evaluation as glycosidase inhibitors." *Tetrahedron: Asymmetry.* **17**, 2684-2688.

- Enders, D., Voith, M. y Lenzen, A. (2005) "The Dihydroxyacetone Unit - A Versatile C<sub>3</sub> Building Block in Organic Synthesis." *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 1304-1325.
- Enders, D. y Narine, A.A. (2008) "Lessons from Nature: Biomimetic Organocatalytic Carbon-Carbon Bond Formations." *J. Org. Chem.* **73**, 7857-7870.
- Enders, D., Hüttel, M.R.M. y Niemeier, O. (2008) "Biomimetic Organocatalytic C-C-Bond Formations" In *Organocatalysis*. Reetz, M.T., List, B., Jaroch, S. y Weinmann, H. (eds.), pp. 45-124, *Springer*, Berlin, Heidelberg.
- Engelhardt, H. (2004) "Correcting kinetic analyses of metal-nucleotide binding enzymes." *Anal. Biochem.* **328**, 76-80.
- Erni, B., Siebold, C., Christen, S., Srinivas, A., Oberholzer, A. y Baumann, U. (2006) "Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases." *Cell Mol. Life. Sci.* **63**, 890-900.
- Espelt, L., Parella, T., Bujons, J., Solans, C., Joglar, J., Delgado, A. y Clapés, P. (2003) "Stereoselective aldol additions catalyzed by dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases in emulsion systems: preparation and structural characterization of linear and cyclic iminopolyols from aminoaldehydes." *Chem. Eur. J.* **9**, 4887-4899.
- Espelt, L., Bujons, J., Parella, T., Calveras, J., Joglar, J., Delgado, A. y Clapés, P. (2005) "Aldol Additions of Dihydroxyacetone Phosphate to N-Cbz-Amino Aldehydes Catalyzed by L-Fucose-1-Phosphate Aldolase in Emulsion Systems: Inversion of Stereoselectivity as a Function of the Acceptor Aldehyde." *Chem. Eur. J.* **11**, 1392-1401.
- Eyrisch, O., Sinerius, G. y Fessner, W.D. (1993) "Facile de novo synthesis and NMR spectroscopic characterization of D-tagatose 1,6-bisphosphate." *Carbohydr. Res.* **238**, 287-306.
- Faber, K. y Kroutil, W. (2005) "New enzymes for biotransformations." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 181-187.
- Fernández-Gacio, A., Codina, A., Fastrez, J., Riant, O. y Soumillion, P. (2006) "Transforming carbonic anhydrase into epoxide synthase by metal exchange." *ChemBioChem.* **7**, 1013-1016.
- Ferroni, E.L., DiTella, V., Ghanayem, N., Jeske, R., Jodlowski, C., O'Connell, M., Styrsky, J., Svoboda, R., Venkataraman, A. y Winkler, B.M. (1999) "A three-step preparation of dihydroxyacetone phosphate dimethyl acetal." *J. Org. Chem.* **64**, 4943-4945.
- Fessner, W.-D., Sinerius, G., Schneider, A., Dreyer, M., Schulz, G.E., Badia, J. y Aguilar, J. (1991) "Diastereoselective enzymatic aldol additions: L-rhamnulose and L-fucose 1-phosphate aldolases from *E. coli*." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 555-558.

- Fessner, W.-D. y Walter, C. (1992) "Artificial Metabolisms for the Asymmetric One-Pot Synthesis of Branched-Chain Saccharides." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31**, 614-616.
- Fessner, W.-D., Badia, J., Eyrisch, O., Schneider, A. y Sinerius, G. (1992) "Enzymes in organic-synthesis. 5. Enzymatic syntheses of rare ketose-1-phosphates." *Tetrahedron Lett.* **33**, 5231-5234.
- Fessner, W.-D. y Sinerius, G. (1994) "Synthesis of dihydroxyacetone phosphate (and isosteric analogues) by enzymatic oxidation: sugars from glycerol." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**, 209-212.
- Fessner, W.-D. (1998) "Enzyme mediated C-C bond formation." *Curr. Op. Chem. Biol.* **2**, 85-97.
- Fessner, W.-D. y Helaine, V. (2001) "Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes." *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 574-586.
- Finkelstein, J. (2007) "Glycochemistry & Glycobiology." *Nature.* **446**, 999-999.
- Fong, S., Machajewski, T.D., Mak, C.C. y Wong, C.-H. (2000) "Directed evolution of D-2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to new variants for the efficient synthesis of D- and L-sugars." *Chem. Biol.* **7**, 873-883.
- Font, D., Sayalero, S., Bastero, A., Jimeno, C. y Pericas, M. A. (2008) "Toward an Artificial Aldolase." *Org. Lett.* **10**, 337-340.
- Forage, R.G. y Foster, M.A., (1982) "Glycerol fermentation in *Klebsiella pneumoniae*: functions of the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratases." *J. Bacteriol.*, **149**, 413-419.
- Fraiz, F.J., Pinto, R.M., Costas, M.J., Avalos, M., Canales, J., Cabezas, A. y Cameselle, J.C. (1998) "Enzymic formation of riboflavin 4',5'-cyclic phosphate from FAD: evidence for a specific low-K<sub>m</sub> FMN cyclase in rat liver." *Biochem J.* **330**, 881-888.
- Friat, L., Roodveldt, C., Manco, G. y Tawfik, D.S. (2006) "The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase." *Biochemistry.* **45**, 13677-13686.
- Galione, A. (1993) "Cyclic ADP-ribose: a new way to control calcium." *Science*, **259**, 325-326.
- Gancedo, C., Llobell, A., Ribas, J.C. y Luchi, F. (1986) "Isolation and characterization of mutants from *Schizosaccharomyces pombe* defective in glycerol catabolism." *Eur. J. Biochem.* **159**, 171-174.
- Gancedo, C. y Flores, C.L. (2008) "Moonlighting proteins in yeasts." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 197-210.

- García-Alles, L.F., Siebold, C., Nyffeler, T.L., Flükiger-Brühwiler, K., Schneider, P., Bürgi, H.B., Baumann, U. y Erni, B. (2004) "Phosphoenolpyruvate- and ATP-dependent dihydroxyacetone kinases: covalent substrate-binding and kinetic mechanism." *Biochemistry*. **43**, 13037-13045.
- García-Junceda, E., Shen, G.-J., Sugai, T. y Wong, C.-H. (1995) "A new strategy for the cloning, overexpression and one step purification of three DHAP-dependent aldolases: Rhamnulose-1-phosphate aldolase, fucose-1-phosphate aldolase and tagatose-1,6-diphosphate aldolase1." *Bioorg. Med. Chem.* **3**, 945-953.
- García-Junceda, E., García-García, J.F., Bastida, A. y Fernandez-Mayoralas, A. (2004) "Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades." *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 1817-1834.
- García-Junceda, E. (ed.), (2008) "Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis." *Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA*, Weinheim, Germany
- Gaunt, M.J., Johansson, C.C.C., McNally, A. y Vo, N.T. (2007) "Enantioselective organocatalysis." *Drug Discovery Today*. **12**, 8-27.
- Gefflaut, T., Lemaire, M., Valentin, M.L. y Bolte, J. (1997) "A novel efficient synthesis of dihydroxyacetone phosphate and bromoacetol phosphate for use in enzymatic aldol syntheses." *J. Org. Chem.* **62**, 5920-5922.
- Gerlt, J.A. y Babbitt, P.C. (2009) "Enzyme (re)design: lessons from natural evolution and computation." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 10-18.
- Giacalone, F., Gruttadauria, M., Lo Meo, P., Riela, S. y Noto, R. (2008) "New simple hydrophobic proline derivatives as highly active and stereoselective catalysts for the direct asymmetric aldol reaction in aqueous medium." *Adv. Synth. Catal.* **350**, 2747-2760.
- Gijsen, H.J.M., Qiao, L., Fitz, W. y Wong, C.-H. (1996) "Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of carbohydrates and carbohydrate mimetics." *Chem. Rev.* **96**, 443-473.
- Gonzalez, R., Murarka, A., Dharmadi, Y. y Yazdani, S.S. (2008) "A new model for the anaerobic fermentation of glycerol in enteric bacteria: trunk and auxiliary pathways in *Escherichia coli*." *Metab. Eng.* **10**, 234-245.
- Gordon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. y Labarre, J. (1998) "The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*." *J. Biol. Chem.* **273**, 22480-22489.
- Gray, G.R. y Barker, R. (1970) "Studies on the substrates of D-fructose 1,6-bisphosphate aldolase in solution." *Biochemistry*. **9**, 2454-2462.

- Gröger, H. y Wilken, J. (2001) "The application of L-proline as an enzyme mimic and further new asymmetric syntheses using small organic molecules as chiral catalysts." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 529-532.
- Guixé, V. y Babul, J. (1985) "Effect of ATP on phosphofructokinase-2 from *Escherichia coli*. A mutant enzyme altered in the allosteric site for MgATP." *J. Biol. Chem.* **260**, 11001-11005.
- Guixé, V., Rodríguez, P. H. y Babul, J. (1998) "Ligand induced conformational transitions in *Escherichia coli* phosphofructokinase-2: evidence for an allosteric site for MgATP<sup>2-</sup>." *Biochemistry.* **37**, 13269-13275.
- Gutknecht, R., Beutler, R., García-Alles, L.F., Baumann, U. y Erni, B. (2001) "The dihydroxyacetone kinase of *Escherichia coli* utilizes a phosphoprotein instead of ATP as phosphoryldonor." *EMBO J.* **20**, 2480-2486.
- Haeusler, P.A., Dieter, L., Rittle, K.J., Shepler, L.S., Paszkowski, A. L. y Moe O.A. (1992) "Catalytic properties of *Escherichia coli* polyphosphate kinase: an enzyme for ATP regeneration", *Biotechnol. Appl. Biochem.* **15**, 125-133.
- Hakomori, S. (2004) "Carbohydrate-to-carbohydrate interaction in basic cell biology: a brief overview." *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 173-181.
- Hamilton, C.J. (2004) "Enzymes in preparative mono- and oligo-saccharide synthesis." *Nat. Prod. Rep.* **21**, 365-385.
- Heinz, F. y Lamprecht, W. (1961) "Anreicherung und charakterisierung einer triokinase aus leber." *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **324**, 88-100.
- Henderson, D.F. y Toone, E.J. (1999) "Comprehensive Natural Product Chemistry." B. M. Pinto, (ed.); *Elsevier Science B. V*, Amsterdam, **3**, 367-441.
- Hettwer, J., Oldenburg, H. y Flaschel, E. (2002) "Enzymic routes to dihydroxyacetone phosphate or immediate precursors." *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **19**, 215-222.
- Hirschbein, B.L., Mazenod, F.P. y Whitesides, G.M. (1982) "Synthesis of phosphoenolpyruvate and its use in adenosine triphosphate cofactor regeneration." *J. Org. Chem.* **47**, 3765-3766.
- Hofmann, F. (2005) "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." *J. Biol. Chem.* **280**, 1-4.
- Hofmann, K.H. y Babel, W. (1990) "Glycerone kinase from *Candida methyllica*." *Methods Enzymol.* **188**, 451-455.
- Holzhütter, H.G. y Colosimo, A (1989) "SIMFIT: a microcomputer software-toolkit for modelistic studies in biochemistry." *Bioinformatics.* **6**, 23-28.
- Honda, K. y Taniguchi, T. (2006) "IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors." *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644-658.

- Honzatko, R.B., Lauritzen, A.M. y Lipscomb, W.N. (1981) "Metal cation influence on activity and regulation of aspartate carbamoyltransferase." *Biochemistry*, **78**, 898-902.
- Hult, K. y Berglund, P. (2007) "Enzyme promiscuity: mechanism and applications." *Trends. Biotechnol.* **25**, 231-238.
- Imberty, A., Chabre, Yoann, M. y Roy, R. (2008) "Glycomimetics and Glycodendrimers as High Affinity Microbial Anti-adhesins." *Chemistry*. **14**, 7490-7499.
- Itoh, N., Tujibata, Y. y Liu, J.Q. (1999) "Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of the gene encoding dihydroxyacetone kinase isoenzyme I from *Schizosaccharomyces pombe*, and its application to dihydroxyacetone phosphate production." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 193-200.
- Iturrate, L. y García-Junceda, E. (2008) "DHAP-dependent aldolases in the core of multistep processes." In *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. García-Junceda, E. (ed.), pp. 61-81, Wiley-VCH Verlag GMBH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Iturrate, L., Sánchez-Moreno, I., Doyagüez, E.G. y García-Junceda, E. (2009) "Substrate channelling in an engineered bifunctional aldolase/kinase enzyme confers catalytic advantage for C-C bond formation." *Chem. Commun.* **7**, 1721-1723.
- Jeffery, C.J. (2004) "Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins." *Curr Opin Struct Biol.* **14**, 663-668.
- Jenkins, B.T. y Hajra, A.K. (1976) Glycerol kinase and dihydroxyacetone kinase in rat brain. *J. Neurochem.* **26**, 377-385.
- Jiang, L., Althoff, E.A., Clemente, F.R., Doyle, L., Rothlisberger, D., Zanghellini, A., Gallaher, J.L., Betker, J.L., Tanaka, F., Barbas, C.F., Hilvert, D., Houk, K.N., Stoddard, B.L. y Baker, D. (2008) "De Novo Computational Design of Retro-Aldol Enzymes." *Science*. **319**, 1387-1391.
- Jin, R. Z., Tang, J.C. y Lin, E.C. (1983) "Experimental evolution of a novel pathway for glycerol dissimilation in *Escherichia coli*." *J. Mol. Evol.* **19**, 429-436.
- Johnson, E.A., Burke, S.K., Forage, R.G. y Lin, C.C. (1984) "Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Klebsiella pneumoniae*." *J. Bacteriol.* **160**, 55-60.
- Jung, S.H., Jeong, J.H., Miller, P. y Wong, C.-H. (1994) "An efficient multigram-scale preparation of dihydroxyacetone phosphate." *J. Org. Chem.* **59**, 7182-7184.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T. y Akira, S. (2006) "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature*. **441**, 101-105.



- Kato, N., Yoshikawa, K., Tanaka, K., Shimano, M. y Sakazawa, C. (1988) "Dihydroxyacetone kinase from a methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha* CBS4732-purification, characterization and physiological role." *Arch. Microbiol.* **150**, 155-159.
- Kazlauskas, R.J. (2005) "Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 195-201.
- Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M. y Maguire, M.E. (2002) "SitABCD is the alkaline Mn<sup>2+</sup> transporter of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." *J. Bacteriol.* **184**, 3159-3166.
- Kehres, D.G. y Maguire, M.E. (2003) "Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria." *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 263-290.
- Khersonsky, O., Roodveldt, C. y Tawfik, D.S. (2006) "Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects." *Curr Opin Chem Biol.* **10**, 498-508.
- Kimura, M. (1980) "A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences." *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.
- Kimura, T., Takahashi, M., Yoshihara, K., Furuichi, T., Suzuki, K., Imai, K., Karita, S., Sakka, K. y Ohmiya, K. (1998) "Cloning and characterization of two genes encoding dihydroxyacetone kinase from *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354." *Biochim. Biophys. Acta.* **1442**, 361-368.
- Kinch, L.N., Cheek, S. y Grishin, N.V. (2005) "EDD, a novel phosphotransferase domain common to mannose transporter EIIA, dihydroxyacetone kinase, and DegV." *Protein Sci.* **14**, 360-367.
- Kirkland, P.A., Reuter, C.J. y Maupin-Furlow, J.A. (2007) "Effect of proteasome inhibitor clasto-lactacystin-beta-lactone on the proteome of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*." *Microbiology.* **153**, 2271-2280.
- Koeller, K.M. y Wong, C.-H. (2000) "Emerging themes in medicinal glycoscience." *Nat. Biotechnol.* **18**, 835-841.
- Kurien, B.T. y Scofield, R.H. (2002) "Extraction of nucleic acid fragments from gels", *Anal. Biochem.* **302**, 1-9.
- Lee, J.H., Van Montagu, M. y Verbuggen, N. (1999) "A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5873-5877.
- Lerner, H.R. y Avron, M. (1977) "Dihydroxyacetone kinase activity in *Dunaliella parva*." *Plant Physiol.* **59**, 15-17.
- Lerner, H.R., Sussman, I. y Avrom, M. (1980) "Characterization and partial purification of dihydroxyacetone kinase in *Dunaliella salina*." *Biochim. Biophys. Acta.* **615**, 1-9.

- Li, C., Feng, X.-W., Wang, N., Zhou, Y.-J. y Yu, X.-Q. (2008) "Biocatalytic promiscuity: the first lipase-catalysed asymmetric aldol reaction." *Green Chemistry*. **10**, 616-618.
- List, B., Lerner, R.A. y Barbas, C.F. (2000) "Proline-catalyzed direct asymmetric aldol reactions." *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 2395-2396.
- Liu, K.K.-C., Kajimoto, T., Chen, L., Zhong, Z., Ichikawa, Y. y Wong, C.-H. (1991) "Use of dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolases in the synthesis of deoxy aza sugars" *J. Org. Chem.* **56**, 6280-6289.
- Looger, L.L., Dwyer, M.A., Smith, J.J. y Hellinga, H.W. (2003) "Computational design of receptor and sensor proteins with novel functions." *Nature* **423**, 185-190.
- Lüers, G.H., Advani, R., Wenzel, T. y Subramani, S. (1998) "The *Picchia pastoris* dihydroxyacetone kinase is a PTS1-containing, but cytosolic, protein that is essential for growth on methanol." *Yeast*. **14**, 759-771.
- Machajewski, T.D. y Wong, C.-H. (2000) "The catalytic asymmetric aldol reaction." *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 1352-1374.
- Magnani, J.L. (2004) "The discovery, biology and drug development of sialyl Le<sup>a</sup> and sialyl Le<sup>x</sup>" *Arch. Biochem. Biophys.* **426**, 122-131.
- Malleron, A. y David, S. (1996) "An enzymic approach to sequence 12-20 of amphotericin B." *New J. Chem.* **20**, 153-159.
- Markert, M. y Mahrwald, R. (2008) "Total Syntheses of Carbohydrates: Organocatalyzed Aldol Additions of Dihydroxyacetone." *Chemistry*. **14**, 40-48.
- Marshall, J.H., May, J.W., Sloan, J. y Vasiliadis, G.E. (1986) "Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Schizosaccharomyces pombe*." *J. Gen. Microbiol.* **132**, 2611-2614.
- Martin-Rendon, E. y Blake, D.J. (2003) "Protein glycosylation in disease: new insights into the congenital muscular dystrophies." *Trends. Pharmacol. Sci.* **24**, 178-183.
- Mase, N., Nakai, Y., Ohara, N., Yoda, H., Takabe, K., Tanaka, F. y Barbas, C.F. (2006) "Organocatalytic Direct Asymmetric Aldol Reactions in Water." *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 734-735.
- Meyer, O., Ponaire, S., Rohmer, M. y Grosdemange-Billiard, C. (2006) "Lewis acid mediated regioselective ring opening of benzylglycidol with dibenzyl phosphate: short and attractive synthesis of dihydroxyacetone phosphate." *Org. Lett.* **8**, 4347-4350.
- Mike, M.K.B. (2007) "Carbohydrates as Synthetic Tools in Organic Chemistry." *Chemistry*. **13**, 8648-8659.
- Miwa, I., Kito, Y. y Okuda, J. (1994) "Purification and characterization of triokinase from porcine kidney." *Perp. Biochem.* **24**, 203-223.

- Miyazaki, K., Takenouchi, M., Kondo, H., Noro, N., Suzuki, M. y Tsuda, S. (2006) "Thermal stabilization of *Bacillus subtilis* family-11 xylanase by directed evolution." *J. Biol. Chem.* **281**, 10236-10242.
- Molin, M., Norbeck, J. y Blomberg, A. (2003a) "Dihydroxyacetone kinase in *Saccharomyces cerevisiae* are involved in detoxification of dihydroxyacetone." *J. Biol. Chem.* **278**, 1415-1423.
- Molin, M., Larsson, T., Karlsson, K.A. y Blomberg, A. (2003b) "Fragmentation of dihydroxyacetone kinase 1 from *Saccharomyces cerevisiae* indicates a two-domain structure." *Proteomics*. **3**, 752-763.
- Molin, M. y Blomberg, A. (2006) "Dihydroxyacetone detoxification in *Saccharomyces cerevisiae* involves formaldehyde dissimilation." *Mol. Microbiol.* **60**, 925-938.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. y Olson, A.J. (1998) "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." *J. Comput. Chem.* **19**, 1639-1662.
- Morrison, J.F. (1979) "Approaches to kinetic studies on metal-activated enzymes." *Methods Enzymol* **63**, 257-294.
- Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2004) "Lehninger. Principles of biochemistry, Fourth Edition." *W. H. Freeman*.
- Nobeli, I., Favia, A.D. y Thornton, J.M. (2009) "Protein promiscuity and its implications for biotechnology." *Nat. Biotechnol.* **27**, 157-167.
- Noguchi, T. y Shiba, T. (1998) "Use of *Escherichia coli* polyphosphate kinase for oligosaccharide synthesis." *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 1594-1596.
- Oberholzer, A.E., Schneider, P., Baumann, U. y Erni, B. (2006) "Crystal structure of the nucleotide-binding subunit DhaL of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase." *J. Mol. Biol.* **359**, 539-545.
- Okrasa, K. y Kaslauskas, R.J. (2006) "Manganese-substituted carbonic anhydrase as a new peroxidase." *Chem. Eur. J.* **12**, 1588-1596.
- Okumiy, T., Kroos, M.A., Vliet, L.V., Takeuchi, H., Van der Ploeg, A.T. y Reuser, A.J. (2007) "Chemical chaperones improve transport and enhance stability of mutant alpha-glucosidases in glycogen storage disease type II." *Mol. Genet. Metab.* **90**, 49-57.
- Pederson, R.L., Esker, J., Wong, C.-H. (1991) "An improved synthesis of dihydroxyacetone phosphate." *Tetrahedron. Lett.* **47**, 2643-2648.
- Peisajovich, S.G. y Tawfik, D.S. (2007) "Protein engineers turned evolutionists." *Nat Meth.* **4**, 991-994.

- Perkins, D.N., Pappin, D.J.C., Creasy, D.M. y Cottrell, J.S. (1999) "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." *Electrophoresis*. **20**, 3551-3567.
- Phung, A.N., Zannetti, M.T., Whited, G. y Fessner, W.-D. (2003) "Stereospecific biocatalytic synthesis of pancratiostatins analogues." *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4821-4824.
- Pollack, S.J., Jacobs, J.W. y Schultz, P.G (1986) "Selective chemical catalysis by an antibody." *Science*. **234**, 1570-1573.
- Portais, J.C. y Delort, A.M. (2002) "Carbohydrate cycling in micro-organisms: what can (13)C-NMR tell us?." *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 375-402.
- Postma, P.W., Lengeler, J.W. y Jacobson, G.R. (1996) "Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems." In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt F. C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B. y Magasanik B. (eds.), pp. 1149-1174, ASM Press, Washington DC, USA.
- Qi, D., Tann, C.M., Haring, D. y Distefano, M.D. (2001) "Generation of new enzymes via covalent modification of existing proteins." *Chem. Rev.* **101**, 3081-3112.
- Ramasastri, S.S., Albertshofer, K., Utsumi, N., Tanaka, F. y Barbas, C.F. (2007) "Mimicking Fructose and Rhamnulose Aldolases: Organocatalytic Aldol Reactions with Unprotected Dihydroxyacetone." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 5572-5575.
- Ramasastri, S.S., Albertshofer, K., Utsumi, N. y Barbas, C.F.. (2008) "Water-compatible organocatalysts for direct asymmetric syn-aldol reactions of dihydroxyacetone and aldehydes." *Org Lett.* **10**, 1621-1624.
- Rasila, T.S., Pajunen, M.I. y Savilahti, H. (2009) "Critical evaluation of random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction protocols, *Escherichia coli* mutator strain, and hydroxylamine treatment." *Anal. Biochem.* **388**, 71-80.
- Reetz, M. T. y Carballeira, J. D. (2007) "Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes." *Nat. Protocols*. **2**, 891-903.
- Reetz, M. T., Kahakeaw, D. y Sanchis, J. (2009) "Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis." *Molecular BioSystems*. **5**, 115-122.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M. y Hohmann, S., (2000) "The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes." *J. Biol. Chem.* **275**, 8290-8300.
- Riley, M., Abe, T., Arnaud, M.B., Berlyn, M.K., Blattner, F.R., Chaudhuri, R.R., Glasner, J.D., Horiuchi, T., Keseler, I.M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N.T., Plunkett, G., Rudd,

- K.E., Serres, M.H., Thomas, G.H., Thomson, N.R., Wishart, D. y Wanner, B.L. (2006) "Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation." *Nucleic Acids Res.* **34**, 1-9.
- Ritter, T.K. y Wong, C.-H. (2001) "Carbohydrate-based antibiotics: a new approach to tackling the problem of resistance." *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 3508-3533.
- Rudolph, F.B. y Fromm, H.J. (1979) "Plotting methods for analyzing enzyme rate data." *Methods Enzymol.* **63**, 138-159.
- Saier, M.H., Hvorup, R.N. y Barabote, R.D. (2005) "Evolution of the bacterial phosphotransferase system: from carriers and enzymes to group translocators." *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 220-224.
- Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K. y Soucaille, P. (2001) "Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grow on glucose-glycerol mixtures." *J. Bacteriol.* **183**, 1748-1754.
- Sakthivel, K., Notz, W., Bui, T. y Barbas, C.F. (2001) "Amino Acid Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions: A Bioorganic Approach to Catalytic Asymmetric Carbon-Carbon Bond-Forming Reactions." *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5260-5267.
- Sambrook, J., Fritsch E.F. y Maniatis T. (1989) "Molecular cloning: a laboratory manual." (Nolan, C., ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Samland, A. y Sprenger, G. (2006) "Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 253-264.
- Sanchez, C., Zhu, L., Braña, A.F., Salas, A.P., Rohr, J., Méndez, C. y Salas, J.A. (2005) "Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 461-466.
- Sánchez-Moreno, I., García-García, J.F., Bastida, A. y García-Junceda, E. (2004) "Multienzyme system for dihydroxyacetone phosphate-dependent aldolase catalyzed C–C bond formation from dihydroxyacetone." *Chem. Commun.* 1634-1635.
- Sánchez-Moreno, I., Iturrate, L., Martín-Hoyos, R., Jimeno, M.L., Mena, M., Bastida, A. y García-Junceda, E. (2009) "From kinase to cyclase: an unusual example of catalytic promiscuity modulated by metal switching." *ChemBioChem.* **10**, 225-229.
- Schägger, H. (2006) "Tricine-SDS-PAGE." *Nature Protocols.* **1**, 16-22.
- Schoevaart, R., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (1999) "Class I fructose-1,6-bisphosphate aldolases as catalysts for asymmetric aldol reactions." *Tetrahedron Asymm.* **10**, 705-711.
- Schoevaart, R., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (2000) "Stereochemistry of nonnatural aldol reactions catalyzed by DHAP aldolases." *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 349-352.

- Schoevaart, R., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (2001) "Facile enzymatic aldol reactions with dihydroxyacetone in the presence of arsenate." *J. Org. Chem.* **66**, 4559-4562.
- Schümperli, M., Pellaux, R. y Panke, S. (2007) "Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 33-45.
- Schürmann, M. y Sprenger, G.A. (2001) "Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases." *J. Biol. Chem.* **276**, 11055-11061.
- Schultz, M., Waldmann, H., Vogt, W. y Kunz, H. (1990) " Stereospecific C-C bond formation with rabbit muscle aldolase: a chemoenzymatic synthesis of (+)-exo-brevicomin." *Tetrahedron Lett.* **31**, 867-868.
- Schurmann, M., Schurmann, M. y Sprenger, G. A. (2002) "Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars." *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **19**, 247-252.
- Seeberger, P.H. y Werz, D.B. (2007) "Synthesis and medical applications of oligosaccharides." *Nature.* **446**, 1046-1051.
- Shimagaki, M., Muneshima, H., Kubota, M. y Oishi, T. (1993) "Chemoenzymatic carbon-carbon bond formation leading to noncarbohydrate derivative: stereoselective synthesis of pentamycin C-11-C-16 fragment." *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 282-286.
- Siebold, C., Flükiger, K., Beutler, R. y Erni, B. (2001) "Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS)." *FEBS Lett.* **504**, 104-111.
- Siebold, C., Arnold, I., García-Alles, L.F., Baumann U. y Erni, B. (2003a) "Crystal Structure of the *Citrobacter freundii* dihydroxyacetone kinase reveals an eight-stranded  $\alpha$ -helical barrel ATP-binding domain." *J. Biol. Chem.* **278**, 48236-48244.
- Siebold, C., García-Alles, L.F., Erni, B. y Baumann, U. (2003b) "A novel mechanism of covalent substrate binding in the X-ray structure of the DhaK subunit of the *Escherichia coli* dihydroxyacetone kinase." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 8188-8192.
- Silvestri, M.G., Desantis, G., Mitchell, M. y Wong, C.-H. (2003) "Asymmetric aldol reactions using aldolases." *Topics in Stereochemistry*, Vol 23. pp. 267-342.
- Sims, P.A. y Reed, G.H. (2005) "Method for the enzymatic synthesis of 2-phospho-D-glycerate from adenosine 5'-triphosphate and D-glycerate via D-glycerate-2-kinase" *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **32**, 77-81.
- Sobolov, S.B., Bartoszko-Malik, A., Oeschger, T.R. y Montalbano, M.M. (1994) "Cross-linked enzyme crystals of fructose diphosphate aldolase: development as a biocatalyst for synthesis." *Tetrahedron Lett.* **35**, 7751-7754.

- Stemmer, W.P.C. (1994a) "DNA Shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10747-10751.
- Stemmer, W.P.C. (1994b) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", *Nature.* **370**, 389-391.
- Suau, T., Álvaro, G., Benaiges, M.D. y López-Santín, J. (2005) "Influence of secondary reactions on the synthetic efficiency of DHAP-aldolases." *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 48-55.
- Suau, T., Alvaro, G., Benaiges, M.D. y Lopez-Santin, J. (2006) "Influence of secondary reactions on the synthetic efficiency of DHAP-aldolases." *Biotechnol. Bioeng.* **93**, 48-55.
- Sugiyama, M., Hong, Z.Y., Whalen, L.J., Greenberg, W.A. y Wong, C.-H. (2006) "Borate as a phosphate ester mimic in aldolase-catalyzed reactions: Practical synthesis of L-fructose and L-iminocyclitols." *Adv. Synth. Catal.* **348**, 2555-2559.
- Sugiyama, M., Hong, Z., Liang, P.H., Dean, S.M., Whalen, L.J., Greenberg, W.A. y Wong, C.-H. (2007a) "D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols." *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14811-14817.
- Sugiyama, M., Hong, Z., Greenberg, W.A. y Wong, C.-H. (2007b) "*In vivo* selection for the directed evolution of l-rhamnulose aldolase from l-rhamnulose-1-phosphate aldolase (RhaD)." *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 5905-5911.
- Sukumaran, J. y Hanefeld, U. (2005) "Enantioselective C–C bond synthesis catalysed by enzymes." *Chem. Soc. Rev.* **34**, 530-542.
- Suzuki, Y. (2006) "Beta-galactosidase deficiency: an approach to chaperone therapy." *J. Inherit. Metab. Dis.* **29**, 471-476.
- Suzuki, Y. (2008) "Chemical chaperone therapy for GM1-gangliosidosis." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS).* **65**, 351-353.
- Tachiki, T., Chigiri, E. y Tochikura, T. (1987) "Purification and properties of dihydroxyacetone kinase from *Gluconobacter suboxydans*." *J. Ferment. Technol.* **65**, 107-110.
- Tanaka, N., Dumay, V., Liao, Q., Lange, A.J. y Wever, R. (2002) "Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* ser. *typhimurium*." *Eur. J. Biochem.* **269**, 2162-2167.
- Tanaka, F., Fuller, R., Shim, H., Lerner, R.A. y Barbas, C.F. (2004) "Evolution of aldolase antibodies in vitro: correlation of catalytic activity and reaction-based selection." *J. Mol. Biol.* **335**, 1007-1018.
- Tanaka, F., Fuller, R. y Barbas, C.F. (2005) "Development of small designer aldolase enzymes; catalytic activity, folding, and substrate specificity." *Biochemistry.* **44**, 7583-7592.

- Tao, H. y Cornish, V.W. (2002) "Milestones in directed enzyme evolution." *Curr Opin Chem Biol.* **6**, 858-864.
- Tessier, F.J., Monnier, V.M., Sayre, L.A. y Kornfield, J.A. (2003) "Triosidines: novel maillard reaction products and crosslinks from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues." *Biochem. J.* **369**, 705-719.
- Tracewell, C.A. y Arnold, F.H. (2009) "Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 3-9.
- Tramontano, A., Janda, K.D. y Lerner, R.A. (1986) "Catalytic antibodies." *Science.* **234**, 1566-1570.
- Uzcátegui, N.L., Carmona-Gutiérrez, D., Denninger, V., Schoenfeld, C., Lang, F., Figarella, K. y Duszenko, M. (2007) "Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death." *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3960-3968.
- Valentin, M.L. y Bolte, J. (1995) "A convenient synthesis of DHAP from acetone." *Bull. Soc. Chim. Fr.* **132**, 1167-1171.
- Valetti, F. y Gilardi, G. (2004) "Directed evolution of enzymes for product chemistry." *Nat. Prod. Rep.* **21**, 490-511.
- van Aalten, D.M.F. y Strynadka, N.C.J. (2008) "Putting glycobiology on a structural footing." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 525-526.
- van de Velde, F., Könemann, L., van Rantwijk, F. y Sheldon, R.A. (2000) "The rational design of semisynthetic peroxidases." *Biotechnol. Bioeng.* **67**, 87-96.
- van der Klei, I.J., van der Heide, M., Baerends, R.J., Rechinger, K.B., Nicolay, K., Kiel, J.A. y Veenhuijsen, M. (1998) "The *Hansenula polymorpha* *per6* mutant is affected in two adjacent genes which encode dihydroxyacetone kinase and a novel protein, Pak1p, involved in peroxisome integrity." *Curr. Genet.* **34**, 1-11.
- van der Spoel, A.C., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Charlton, H.M., Moore, H.D., Dwek, R.A. y Platt, F.M. (2002) "Reversible infertility in male mice after oral administration of alkylated imino sugars: a nonhormonal approach to male contraception." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 17173-17178.
- van Herk, T., Hartog, A. F., Schoemaker, H. E. y Wever, R. (2006) "Simple enzymatic in situ generation of dihydroxyacetone phosphate and its use in a cascade reaction for the production of carbohydrates: Increased efficiency by phosphate cycling." *J. Org. Chem.* **71**, 6244-6247.
- van Loo, B., Lutje Spelberg, J.H., Kingma, J., Sonke, T., Wubbolts, M.G. y Janssen, D.B. (2004) "Directed evolution of epoxide hydrolase from *A. radiobacter* toward higher enantioselectivity by Error-Prone PCR and DNA Shuffling." *Chem. Biol.* **11**, 981-990.



- von Itzstein, M. (2008) "Disease-associated carbohydrate-recognising proteins and structure-based inhibitor design." *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 558-566.
- Wada, M., Hsu, C.-C., Franke, D., Mitchell, M., Heine, A., Wilson, I. y Wong, C.-H. (2003) "Directed evolution of N-acetylneuraminic acid aldolase to catalyze enantiomeric aldol reactions.", *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 2091-2098.
- Wagner, A. (2005) "Robustness, evolvability, and neutrality." *FEBS Lett.* **579**, 1772-1778.
- Wagner, J., Lerner, R.A. y Barbas, C.F. (1995) "Efficient aldolase catalytic antibodies that use the enamine mechanism of natural enzymes." *Science*. **270**, 1797-800.
- Wang, W., Sun, J., Hartlep, M., Deckwer, W.-D. y Zeng, A.-P. (2003) "Combined use of proteomic Analysis and enzyme activity assay for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*." *Biotechnol. Bioeng.* **83**, 525-536.
- Wang, X. y Kemp, R.G. (2001) "Reaction path of phosphofructo-1-kinase is altered by mutagenesis and alternative substrates." *Biochemistry*, **40**, 3938-3942.
- Watanabe, S., Trosper, T., Lynn, M. y Evenson, L. (1962) "The magnesium binding constants of adenosinetriphosphate and some other compounds estimated by the use of fluorescence of magnesium-8-hydroxyquinoline." *J. Biochem.* **54**, 17-24.
- Watanabe, S., Frantz, W. and Trottier, D. (1963) "Fluorescence of magnesium-, calcium- and zinc-8-quinolinol complexes." *Anal. Biochem.* **5**, 345-359.
- Weinhouse, H. y Benziman, M. (1976) "Phosphorylation of glycerol and dihydroxyacetone in *Acetobacter xylinum* and its possible regulatory role." *J. Bacteriol.* **127**, 747-754.
- Wong, C.-H. y Whitesides, G.M. (1983) "Synthesis of sugars by aldolase catalyzed condensation reactions." *J. Org. Chem.* **48**, 3199-3205.
- Xu, L.V. y Lu, Y. (2008) "Primary amino acids: privileged catalysts in enantioselective organocatalysis." *Org. Biomol. Chem.* **6**, 2047-2053.
- Yanase, H., Okuda, M., Kita, K., Sato, Y., Shibata, K., Sakai, Y. y Kato, N. (1995) "Enzymatic preparation of [1, 3-<sup>13</sup>C] dihydroxyacetone phosphate from [<sup>13</sup>C] methanol and hydroxypyruvate using the methanol-assimilating system of methylotrophic yeasts." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 228-234.
- Yarema, K.J. y Bertozzi, C.R. (1998) "Chemical approaches to glycobiology and emerging carbohydrate-based therapeutic agents." *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 49-61.
- Yoshihara, K., Shimada, Y., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K. y Ohmiya, K. (1996) "Purification and characterization of two dihydroxyacetone kinases from *Schizosaccharomyces pombe* IFO 0354." *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4663-4665.
- Yoshikuni, Y., Ferrin, T. E. y Keasling, J. D. (2006) "Designed divergent evolution of enzyme function." *Nature*. **440**, 1078-1082.

- Yuan, L., Kurek, I., English, J. y Keenan, R. (2005) "Laboratory-directed protein evolution." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 373-392.
- Yuen, C. M. y Liu, D. R. (2007) "Dissecting protein structure and function using directed evolution." *Nat Meth.* **4**, 995-997.
- Yurimoto, H., Kato, N. y Sakai, Y. (2005) "Assimilation, dissimilation, and detoxification of formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism." *Chem. Rec.* **5**, 367-375.
- Zagalak, B., Frey, P.A., Karabatsos, G.L. y Abeles, R.H. (1966) "The stereochemistry of the conversion of D and L 1,2-propanediols to propionaldehyde." *J. Biol. Chem.* **241**, 3028-3035.
- Zheng, R. L. y Kemp, R. G. (1992) "The mechanism of ATP inhibition of wild type and mutant phosphofructo-1-kinase from *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* **267**, 23640-23645.
- Zumarraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Plou, F. J., Ballesteros, A. y Alcalde, M. (2007) "In Vitro Evolution of a Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Cosolvents." *Chem. Biol.* **14**, 1052-1064.
- Zurbriggen, A., Jeckelmann, J.-M., Christen, S., Bieniossek, C., Baumann, U. y Erni, B. (2008) "X-ray Structures of the Three *Lactococcus lactis* Dihydroxyacetone Kinase Subunits and of a Transient Intersubunit Complex." *J. Biol. Chem.* **283**, 35789-35796.